

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

VECTEUR ONCOLYTIQUE VIRAL PERMETTANT D'EXPRIMER LE GÈNE CODANT
POUR LA PROTÉINE M DU VIRUS DE LA STOMATITE VÉSICULAIRE SOUS LE
CONTRÔLE D'UN SYSTÈME D'EXPRESSION INDUCTIBLE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

IAN BOISSEAU

FÉVRIER 2007

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Afin d'éclairer certains étudiants ayant fréquenté le labo de Laurent auparavant, je dirais en guise d'introduction que je crois savoir aujourd'hui par quelle mouche vous avez été piqués, je crois cependant avoir été piqué à mon tour. Les effets secondaires de cette piqûre durent maintenant depuis deux ans et demie, et ceux-ci m'ont forcé à entreprendre et à mener à terme une Maîtrise en Biologie, quel désastre ! Toutefois, la vilaine mouche du labo reste toujours introuvable, malgré le déménagement ! Vous aurez bien sûr deviné que la piqûre en question, c'est en fait la piqûre pour le monde de la recherche scientifique. Au terme de ce périple dans le monde universitaire, je ne regrette aucun des moments que j'ai vécus ces deux dernières années, loin de là je vous dirais.

Au cours de ce parcours, j'ai eu la chance de mettre sur papier mon propre projet de recherche et de le réaliser en toute autonomie au laboratoire. J'ai pu aussi travailler avec des collègues de labo très sympas, qui sont devenus avec le temps des amis. Merci Rose, Jean-mi, Fred, Étienne et Christian, les folles discussions de labo vont me manquer. Par dessus tout, j'ai pu être encadré par un mentor très compréhensif, qui a su me transmettre la passion pour la recherche par nos discussions nombreuses sur divers sujets, mais surtout sur le VSV. Les congrès étaient pas mal aussi ! Ce mentor s'est vite transformé en ami, merci Laurent. C'est fou ce que les relations étudiant-professeur changent au 2^{ème} cycle ! Merci aussi à mon co-directeur Éric Rassart, personnage bien sympathique qui a su me conseiller sur certains aspects de mon projet, et à quelques membres de son labo, dont Elsy pour les discussions enrichissantes.

Merci également à ma sœur Karine qui n'a cessé de poser des questions pour en savoir un peu plus sur ce que je faisais exactement avec mes virus, t'inquiète la sœur. Une mention également aux amis qui m'ont encouragé, mais aussi qui m'ont forcé à devenir vulgarisateur scientifique à mes heures, faut croire que c'est formateur une discussion avec un non initié à la science ! Finalement, un merci bien particulier à ma fiancée, Mélanie, qui a su m'encourager aux bons moments et quand le moral était soudainement parti autre part.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
RÉSUMÉ	xiii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : ÉTAT DES CONNAISSANCES	3
1.1 Le cancer	3
1.1.1 Incidence du cancer dans le monde et perspectives	3
1.1.2 Incidence du cancer au Canada et perspectives	5
1.1.3 Traitements actuellement utilisés au Canada	6
1.1.4 Traitements en développement	7
1.2 L'apoptose	8
1.2.1 Apoptose versus Nécrose	9
1.2.2 Voie d'activation intrinsèque de l'apoptose	10
1.2.3 Voie d'activation extrinsèque de l'apoptose	11
1.2.4 Processus des événements associés à l'apoptose	11
1.3 Le virus de la Stomatite vésiculaire	12
1.3.1 Structure du Virus de la Stomatite vésiculaire	13
1.3.2 Protéine M et pathogenèse cellulaire	15
1.4 Vecteurs de thérapie génique	18

1.4.1	Méthodes non virales de transfert de gène	19
1.4.2	Méthodes virales de transfert de gène	22
1.5	Les systèmes d'expression inductibles	26
1.6	Oncolyse virale	31
1.7	Hypothèses générales de travail	31
CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES		33
2.1	Construction des vecteurs pL6N2-RHS3H/ZF2-PL-EGFP, pL6N2-RHS3H/ZF2-PL-MTP6 et pL6N2-R _H S3H/ZF2-PL-MT1026	33
2.1.1	Vecteur pL6N2-R _H S3H/ZF2-PL-EGFP	33
2.1.2	Vecteur pL6N2-RHS3H/ZF2-PL-MTP6	33
2.1.3	Vecteur pL6N2-RHS3H/ZF2-PL-MT1026	34
2.2	Production d'acides nucléiques pour les transfections	34
2.3	Séquençage de l'insert des vecteurs pL6N2-RHS3H/ZF2-PL-EGFP, pL6N2-R _H S3H/ZF2-PL-MTP6 et pL6N2-R _H S3H/ZF2-PL-MT1026	35
2.4	Culture des lignées cellulaires	35
2.4.1	Lignées cellulaires NIH 3T3, NIH 3T3 <i>Ras</i> et Phoenix écotrope	35
2.4.2	Lignées cellulaires HeLa et L-929	36
2.5	Transfections transitoires des vecteurs, induction et détection	36
2.5.1	Transfection transitoire du vecteur pL6N2-R _H S3H/ZF2-PL-EGFP et microscopie confocale	36
2.5.2	Transfection transitoire du vecteur pL6N2-R _H S3H/ZF2-PL-MTP6 et immunofluorescence indirecte	37
2.5.3	Co-transfection de pL6N2-R _H S3H/ZF2-PL-EGFP et pL6N2-R _H S3H/ZF2-PL-MTP6	37

2.5.4	Transfection transitoire du vecteur pL ₆ N ₂ -R _H S3H/ZF2-PL-MTP6 et évaluation du contenu en ADN	38
2.6	Lignées cellulaires stables	38
2.6.1	Établissement des lignées cellulaires stables	38
2.6.2	Évaluation de la viabilité des lignées stables après induction de l'expression de la protéine M	39
2.7	Analyse de l'expression inducible	40
2.7.1	Détection de la protéine M par Immunobuvardage	40
2.7.2	Détection de l'ARN _m du gène M par RT-PCR	40
2.8	Production des virus/vecteurs pL ₆ N ₂ -R _H S3H/ZF2-PL-EGFP, pL ₆ N ₂ -R _H S3H/ZF2-PL-MTP6 et pL ₆ N ₂ -R _H S3H/ZF2-PL-MT1026	41
2.9	Titration des particules rétrovirales infectieuses des virus/vecteurs pL ₆ N ₂ -R _H S3H/ZF2-PL-EGFP, pL ₆ N ₂ -R _H S3H/ZF2-PL-MTP6 et pL ₆ N ₂ -R _H S3H/ZF2-PL-MT1026	42
CHAPITRE III : RÉSULTATS		43
3.1	Évaluation de la fonctionnalité du système d'expression inducible	43
3.2	Transfection du vecteur pL ₆ N ₂ -R _H S3H/ZF2-PL-MTP6 et immunofluorescence indirecte	44
3.3	Co-transfection de pL ₆ N ₂ -R _H S3H/ZF2-PL-EGFP et pL ₆ N ₂ -R _H S3H/ZF2-PL-MTP6	44
3.4	Transfection du vecteur pL ₆ N ₂ -R _H S3H/ZF2-PL-MTP6 et évaluation du contenu en ADN	47
3.5	Établissement de lignées cellulaires stables	47
3.5.1	Évaluation de la viabilité des clones stables de la lignée cellulaire HeLa	50
3.5.2	Évaluation de la viabilité des clones stables des lignées NIH 3T3 et NIH 3T3 <i>Ras</i>	52

3.6	Détection de M par immunobuvardage chez les clones stables NIH 3T3 et NIH 3T3 <i>Ras</i>	68
3.7	Détection de l'ARN _m du gène M par RT-PCR chez les clones stables NIH 3T3 et NIH 3T3 <i>Ras</i>	68
CHAPITRE IV : DISCUSSION		72
CONCLUSION		82
RÉFÉRENCES		84

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1	Organisation structurale et génomique du Virus de la Stomatite Vésiculaire.....14
2	Système d'expression inductible à un analogue de la rapamycine.....29
3	Transfection du vecteur pL ₆ N ₂ -R _H S3H/ZF2-PL-EGFP sur les lignées cellulaires NIH3T3, HeLa et L-929.....45
4	Transfection du vecteur pL ₆ N ₂ -R _H S3H/ZF2-PL-MTP6 sur les lignées cellulaires HeLa et L-929 et immunofluorescence indirecte.....46
5	Co-transfection des vecteurs pL ₆ N ₂ -R _H S3H/ZF2-PL-EGFP et pL ₆ N ₂ -R _H S3H/ZF2-PL-MTP6 sur les lignées cellulaires HeLa et L-929 et détection.....48
6	Test de viabilité cellulaire après transfection du vecteur pL ₆ N ₂ -R _H S3H/ZF2-PL-MTP6 sur les lignées cellulaires HeLa et L-929.....49
7	Évaluation de la viabilité des clones stables de la lignée cellulaire HeLa.....51
8	Évaluation de la viabilité du clone stable NIH 3T3 MTP6 C4 à 4 heures et 12 heures post-induction.....54-55
9	Évaluation de la viabilité du clone stable NIH 3T3 MTP6 C6 à 4 heures et 12 heures post-induction.....56-57
10	Évaluation de la viabilité du clone stable NIH 3T3 MT1026 C4 à 4 heures et 12 heures post-induction.....58-59
11	Évaluation de la viabilité du clone stable NIH 3T3 MT1026 C6 à 4 heures et 12 heures post-induction.....61-62
12	Évaluation de la viabilité du clone stable NIH 3T3 Ras MT1026 C6 à 4 heures et 12 heures post-induction.....63-64

13	Évaluation de la viabilité des clones stables NIH 3T3 transfectés avec le vecteur pL ₆ N ₂ -R _H S3H/ZF2-PL-MTP6 ou pL ₆ N ₂ -R _H S3H/ZF2-PL-MT1026	65
14	Évaluation de la viabilité des clones stables NIH 3T3 <i>Ras</i> transfectés avec le vecteur pL ₆ N ₂ -R _H S3H/ZF2-PL-MTP6 ou pL ₆ N ₂ -R _H S3H/ZF2-PL-MT1026	67
15	Immunobuvardage pour la détection la protéine M du Virus de la stomatite vésiculaire	69
16	RT-PCR avec l'ARNm de la protéine M du Virus de la stomatite vésiculaire.....	70

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
I Séquences des amorces utilisées pour l'amplification par PCR du gène MT1026....	34
II Séquences des amorces utilisées pour le séquençage du site de clonage multiple de pL ₆ N ₂ -R _H S3H/ZF2-PL.....	35
III Séquences des amorces utilisées pour la réaction de RT-PCR.....	41

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α -MEM	<i>Alpha minimal essential media</i>
A	Adénine
AAV	<i>Adéno-associated virus</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
Akt / PKB	Protéine kinase B
AP21967	Molécule analogue à la rapamycine servant d'inducteur au système d'expression inducible du vecteur pL ₆ N ₂ -R _H S3H/ZF2-PL
Apaf-1	<i>Apoptosis protease activating factor-1</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARN _m	Acide ribonucléique messenger
ARN _{pn}	Petits Acides ribonucléiques nucléaires
ARN _r	Acides ribonucléiques ribosomiaux
ARN _t	Acides ribonucléiques de transfert
ATP	Adénosine triphosphate
Bad	Protéine pro-apoptotique associée à Bcl-xL/Bcl-2
Bax	Protéine pro-apoptotique associée à Bcl-2
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma gene 2, apoptosis inhibitor</i>
Bid	Protéine pro-apoptotique induisant l'activation des caspases
C	Cytosine
CAD	<i>Caspase Activated DNase</i>
CARD	<i>Caspase activation and Recruitment Domain</i>
Ced-3	homologue des caspases 3 et 9 chez <i>Caenorhabditis elegans</i>
cm	Centimètre
c-Myc	Protéine proto-oncogène agissant comme facteur de transcription
C-terminal	Extrémité carboxy terminale d'une protéine
dATP	Déoxy-Adénosine triphosphate
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Media</i>
EcR	<i>Ecdysone Receptor</i>
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FADD	(MORT-1) <i>Fas Associated Death Domain</i>
Fas	(CD95 ou APO-1) Récepteur cellulaire impliqué dans l'apoptose
FasL	Fas ligand
FKBP	<i>FK506 Binding Protein</i>
FRAP	<i>FKBP Rapamycin Associated Protein</i>
G	Guanine
G	Glycoprotéine du VSV
G418	Généticine
Gène MT1026	Gène M de VSV portant une mutation au niveau du 51 ^{ème} acide aminé M51R
Gène MTP6	Gène M d'un variant de VSV n'ayant pas de mutation dans le gène M
H-Ras	Harvey-Ras

HSF-1	<i>Human heat shock factor-1</i>
ICAD	<i>Inhibitor of Caspase-Activated DNase</i>
IL-2	<i>Interleukine 2</i>
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i>
K-Ras	<i>Kirsten-Ras</i>
kpb	<i>Kilopaires de bases</i>
L	<i>Large protéine du VSV</i>
M	<i>Protéine de la matrice du VSV</i>
MAP kinase	<i>Mitogen-Activated-Protein kinase</i>
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MEKK-1	<i>MAPK kinase kinase, qui régule la migration cellulaire</i>
mg	<i>Milligramme</i>
ml	<i>Millilitre</i>
mm	<i>Millimètre</i>
MMLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
M-Ras	<i>Muscle-Ras</i>
N	<i>Nucléoprotéine du VSV</i>
NCS	<i>Newborn calf serum</i>
nM	<i>nanomolaire</i>
nm	<i>nanomètres</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor of immunoglobulin kappa locus in B cells</i>
N-Ras	<i>Neuroblastome-Ras</i>
N-terminal	<i>Extrémité amino terminale d'une protéine</i>
Nup98	<i>Nucléoporine 98</i>
P	<i>Phosphoprotéine du VSV</i>
PAK-2	<i>p21-Activated-Kinase</i>
p53	<i>Tumor suppressor protein p53, apoptosis activator</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PE	<i>Phycoérythrine</i>
pfu	<i>Plaque forming units</i>
PI	<i>Propidium iodide</i>
PI3-K	<i>Phosphatidylinositol-3-OH-kinase</i>
p/v	<i>Poids/volume</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
Rac	<i>Protéine G</i>
Raf-1	<i>Sérine-thréonine kinase Raf-1</i>
Rho	<i>Protéine G</i>
R-Ras	<i>Related-Ras viral oncogene homolog</i>
RT-PCR	<i>Reverse-Transcriptase-Polymerase chain reaction</i>
siRNA	<i>Short interfering ribonucleic acid</i>
T	<i>Thymine</i>
TAF	<i>TBP-associated factors</i>
Taq polymérase	<i>ADN polymérase de la bactérie <i>Thermus aquaticus</i></i>
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TFIID	<i>Transcription factor D of polymerase II</i>

TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TNF-R	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor (TNF) - related apoptosis inducing ligand</i>
U	Uracil
U	Unité
μ g	Microgramme
μ l	Microlitre
μ m	Micromètre
USP	<i>Ultraspiracle protein</i>
VSV	Virus de la Stomatite Vésiculaire
v/v	Volume/volume
WD40	Domaine répété de 40 acides aminés d'un motif tryptophane-aspartate
wt	<i>Wild type</i>

RÉSUMÉ

Le succès dans le domaine de la thérapie génique repose sur la disponibilité de véhicules de transfert ayant une meilleure efficacité que les outils présentement utilisés. Jusqu'à présent, des méthodes non virales et virales de transfert de gène ont été utilisées. Les perspectives de thérapies géniques utilisant les vecteurs viraux peuvent s'appliquer à de nombreuses maladies, dont le cancer. Les vecteurs rétroviraux de type *Moloney Murine Leukemia Virus* (MMLV) ont la capacité d'infecter les cellules en division, telles les cellules transformées.

Il est connu que la protéine M du Virus de la Stomatite Vésiculaire (VSV) contribue à la pathogénèse du virus par son habileté à provoquer l'apoptose. La protéine M contribue directement à l'inhibition de la transcription des gènes cellulaires, du transport nucléocytoplasmique et provoque l'arrondissement cellulaire. Il existe plusieurs variants de VSV portant une mutation ou non au niveau de la protéine M. Le variant T1026 possède une mutation au niveau de l'acide aminé 51 (M₅₁R) de la protéine M, alors que le variant TP6 n'en possède pas. Les deux protéines utilisées dans ce travail, TP6 (sauvage) et T1026 (mutante), génèrent des effets cytopathiques différents chez les cellules lors d'une infection par le virus. Les gènes M des variants TP6 et T1026 du VSV ont été respectivement insérés dans le vecteur rétroviral pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL sous le contrôle d'un système d'expression inductible. L'hypothèse de travail est que l'expression du gène M de VSV, sous contrôle inductible et à partir d'un vecteur rétroviral, devrait permettre de provoquer les mêmes effets cytopathiques menant à l'apoptose. Le vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL a été utilisé afin d'exprimer le transgène M, dans le but d'induire l'apoptose chez les types cellulaires HeLa, et L-929, mais aussi afin de comparer les effets cytopathiques engendrés par l'expression de la protéine M chez une lignée cellulaire saine et transformée, NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras*.

D'abord, les vecteurs ont été transfectés sur les lignées cellulaires HeLa et L-929 et des tests d'apoptose ont été réalisés. Par la suite, des lignées cellulaires stables ont été créées afin de procéder à des tests de viabilité cellulaire à plus grande échelle. Les résultats obtenus montrent que l'expression de la protéine M du VSV, sous contrôle inductible, permet de provoquer la mort des cellules, tant pour la protéine MTP6 sauvage que pour la protéine MT1026 mutante. Les cellules transformées NIH 3T3 *Ras* semblent cependant moins sensibles à l'expression de la protéine M que les cellules saines NIH 3T3. L'expression de la protéine M n'a pas été aussi contrôlée que prévue, en raison de l'inefficacité du système d'expression inductible et plusieurs clones ont été perdus en raison de l'expression basale de la protéine M.

Mots clés : Thérapie génique, Virus de la stomatite vésiculaire, apoptose, oncolyse, vecteur rétroviral

INTRODUCTION

En 1990, le premier essai clinique de transfert de gène était réalisé. Depuis, plus de 5000 patients ont été traités à travers le monde dans le cadre de plus de 400 protocoles de thérapie génique clinique (Rochlitz, 2001). À l'exception d'un seul cas où un décès est survenu, les effets secondaires des thérapies utilisées se sont avérés rares et très légers, et l'expression du transgène a pu être démontrée. Afin d'éliminer les risques potentiels du transfert de gène *in vivo*, comme l'introduction de transformations malignes ou l'évolution de nouvelles maladies virales chez l'homme, le développement de vecteurs ayant un haut degré de sécurité est désormais nécessaire. De plus, la clé d'un éventuel succès dans le domaine de la thérapie génique repose sur la disponibilité de vecteurs de transfert ayant une meilleure efficacité de transduction *in vivo* que les outils présentement utilisés en essais cliniques.

L'idée d'utiliser des virus comme vecteurs de transfert de gènes est intéressante d'abord pour sa simplicité en théorie, mais aussi pour les applications illimitées qu'elle laisse entrevoir. Effectivement, les perspectives de thérapies géniques utilisant des vecteurs de type viraux peuvent s'appliquer à de nombreuses maladies comme la fibrose kystique, certaines maladies vasculaires, des maladies d'origine génétique et le cancer pour ne nommer que celles-là. De nombreuses études cliniques de thérapie génique ayant vu le jour jusqu'à présent ont utilisé des vecteurs viraux de transfert de gène, et plus particulièrement les vecteurs rétroviraux, comptant pour la très grande majorité des études en 2000 (Rochlitz, 2001).

Le Virus de la Stomatite Vésiculaire est un virus faisant partie d'une des plus grandes familles de virus connues, les *Rhabdoviridae*. Le VSV est un virus enveloppé, possédant un génome d'ARN monocaténaire non segmenté à polarité négative de 11 kb, au sein duquel cinq gènes sont présents, N P M G et L, de l'extrémité 3' vers 5'. Il est connu que la protéine M joue un rôle multifonctionnel chez le VSV, c'est-à-dire qu'en plus de ses rôles dans l'assemblage et la condensation de la nucléocapside virale, la protéine M est impliquée dans la pathogénèse cellulaire. Parmi les effets cytopathiques recensés, la protéine M a la capacité

de provoquer l'arrondissement cellulaire, l'inhibition de la transcription des gènes cellulaires et l'inhibition de l'exportation des ARN_m en provenance du noyau par une interaction avec la nucléoporine Nup98. Il existe plusieurs variants du VSV, dont certains portent une mutation au niveau de la protéine M. Quelques-uns des variants portant une mutation au niveau de ce gène n'ont pas la même capacité à inhiber la transcription cellulaire et à provoquer l'apoptose.

Dans le contexte de la présente étude, c'est la capacité de M à induire l'apoptose qui représente un intérêt. Effectivement, la protéine M de VSV peut représenter un outil intéressant dans la perspective de l'utiliser pour causer la mort de cellules indésirables, par exemple des cellules transformées. D'ailleurs, le virus en entier est déjà utilisé dans des études *in vivo* pour ses propriétés pro-apoptotiques. En effet, le VSV_{wt} et divers VSV recombinants ont été utilisés *in vitro* et *in vivo* afin d'évaluer l'efficacité du virus à provoquer l'apoptose chez des cellules cancéreuses.

Les recherches envisagées dans mon étude prévoyaient l'utilisation d'un vecteur rétroviral de type MMLV et l'insertion du gène M des variants TP6 et T1026 du VSV dans celui-ci, sous le contrôle d'un promoteur inductible. Le vecteur a été utilisé dans le but de provoquer l'apoptose chez différents types cellulaires, cellules saines et transformées, *in vitro* en y exprimant le transgène. Ainsi, la protéine M devait être synthétisée et devait pouvoir rapidement causer l'apoptose des cellules pour ce qui est du variant TP6, alors que le variant T1026 devait présenter des effets cytopathiques moins marqués.

L'état des connaissances qui suit, tente de mettre en évidence la problématique actuelle reliée à l'incidence du cancer en général et des traitements utilisés jusqu'à présent. Par la suite, une emphase importante a été accordée aux nouveaux outils de thérapie génique du cancer. Dans un autre ordre d'idées, une revue de la littérature en ce qui a trait au Virus de la Stomatite Vésiculaire et aux mécanismes impliqués dans le processus de l'apoptose s'est avérée un incontournable. Tous ces éléments réunis ensemble ont permis de formuler certaines hypothèses quant à la création et l'utilisation de nouveaux outils permettant de provoquer la mort cellulaire chez des cellules cancéreuses.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Le cancer

Les cellules du corps humain sont soumises à un contrôle très strict de leur développement. Chez l'adulte, les cellules de certains tissus, tels l'épithélium intestinal et les tissus hématopoïétiques de la moelle osseuse par exemple, continuent à proliférer durant toute la vie. Cependant, la majorité des cellules du corps restent quiescentes, c'est-à-dire qu'elles sont en phase G_0 - G_1 du cycle cellulaire et ne prolifèrent pas. Il arrive toutefois que les cellules perdent les points de contrôle de leur développement et se mettent à proliférer excessivement, menant ainsi à la formation d'une tumeur et parfois à un cancer. Le cancer, qui est l'un des problèmes majeurs de santé humaine actuellement, a fait l'objet de recherches considérables au cours des dernières décennies et reste, jusqu'à aujourd'hui, un sujet de pointe dans la communauté scientifique. Environ 100 types de cancers humains sont répertoriés à ce jour. Les méthodes de détection et de traitement des cancers se sont grandement développées et l'épidémiologie des cancers a été largement caractérisée ces dernières années. Pourtant, nous commençons seulement à comprendre les bases de cet ensemble de maladies et le développement de méthodes novatrices de traitement n'en est qu'à ses débuts.

1.1.1 Incidence du cancer dans le monde et perspectives

À l'heure actuelle, le cancer est l'une des causes de mortalité les plus répandues, avec plus de 10 millions de nouveaux cas et 6 millions de morts chaque année dans le monde. Plus de 20 millions de personnes vivent avec un diagnostic de cancer et plus de la moitié de tous les cas de cancer surviennent dans les pays en voie de développement. Cette maladie est responsable d'environ 20% de tous les décès dans les pays développés et 10% dans les pays en voie de développement. Il est projeté que d'ici l'année 2020, il y aura 15 millions de

nouveaux cas de cancer par an et 10 millions de décès directement reliés au cancer annuellement. Cette augmentation en nombre de cas absolus est étroitement associée au vieillissement de la population mondiale (WHO, 2005).

La faible connaissance des causes directes de la maladie permet de prévenir que le tiers de tous les cas de cancer dans le monde. Les efforts attribués à la prévention du cancer sont souvent gênés, d'une part par la faible priorité accordée à cet aspect de la maladie par les gouvernements et les ministères de santé, d'autre part par la confiance excessive envers les traitements actuellement utilisés malgré leurs coûts, et finalement par un considérable débalancement entre les ressources allouées à la recherche sur le cancer et celles dévolues à la prévention et au contrôle. En guise d'exemple, la prévention primaire, la détection précoce et les soins palliatifs sont souvent négligés en faveur d'approches de traitements orientés et spécifiques, même si ces approches ne sont pas rentables et causent parfois des souffrances inutiles aux patients. Un autre exemple est l'incapacité de prendre en considération les inégalités sociales reliées à la prévention et au contrôle du cancer. L'incidence du cancer et la survie sont clairement liés à des facteurs socio-économiques. Les groupes sociaux à revenus faibles sont généralement plus exposés à des facteurs de risque évitables comme les carcinogènes environnementaux, l'alcool, certains agents infectieux et l'usage du tabac. Ces groupes ont moins accès aux services de santé et surtout à l'éducation reliée à la santé, qui leur permettrait de prendre des décisions de manière à protéger et améliorer leur propre santé. La prévention offre bien souvent la stratégie à long terme la plus rentable pour le contrôle du cancer. Ces mesures préventives sont doublement bénéfiques lorsqu'elles contribuent à prévenir d'autres maladies chroniques partageant les mêmes facteurs de risque. Il est estimé qu'environ 43% des décès causés par le cancer sont dus au tabagisme, à une diète malsaine, la consommation d'alcool, un mode de vie inactif et aux infections. De toutes ces causes, l'usage du tabac est la plus importante et la plus facile à éviter dans un contexte de prévention. Effectivement, en plus du cancer du poumon, le tabagisme peut causer le cancer de la cavité orale, du pharynx, du larynx, de l'œsophage, de l'estomac, du pancréas, du foie, de l'urètre, de la vessie urinaire, du col de l'utérus et de la moelle osseuse (WHO, 2005).

L'implantation de stratégies préventives intégrées et efficaces, ciblant des facteurs de risque multiples pour le cancer, devrait réduire l'incidence de cette maladie à long terme à l'échelle mondiale. Les gouvernements devraient donc, en plus de coordonner la recherche dans le domaine du cancer et élaborer des traitements efficaces et ciblés, mettre en œuvre des mesures préventives, de manière à réduire les cas de cancer nécessitant des traitements et un investissement monétaire important. La prévention des facteurs de risque impliqués dans le développement du cancer représente une solution à long terme des plus rentables pour faire face, dans un avenir rapproché, au fardeau grandissant qu'incarne cette maladie.

1.1.2 Incidence du cancer au Canada et perspectives

Au Canada, on estime que 149 000 nouveaux cas de cancer et 69 500 décès dus à cette maladie ont été enregistrés en 2005 (Société canadienne du cancer et Institut national du cancer du Canada, 2005). L'augmentation du nombre de nouveaux cas de cancer au Canada est principalement attribuable à la croissance démographique et au vieillissement de la population, au même titre que ce qui est observé au niveau planétaire. Effectivement, 44% des nouveaux cas de cancer et 60% des décès reliés à cette maladie surviennent chez des sujets de 70 ans et plus. En ce qui concerne les probabilités d'être atteint de cette maladie, d'après les taux d'incidence actuels, 38% des Canadiennes et 44% des Canadiens seront atteints d'un cancer au cours de leur vie. Selon les taux de mortalité actuels, les probabilités de mourir de ce cancer sont de 24% chez les femmes et de 29% chez les hommes, ce qui implique que un Canadien sur quatre mourra du cancer. Au même titre qu'à l'échelle mondiale, la prévention au niveau de certains facteurs de risque pourrait faire une nette différence. Font parti de ces facteurs de risque communs et évitables: le tabagisme, la mauvaise alimentation, la sédentarité, l'excès de poids et l'exposition excessive aux rayons ultraviolets du soleil. À titre d'exemple, en 2002, 21% des Canadiens âgés de plus de 12 ans et 18% des jeunes de 15 à 19 ans fumaient. Aujourd'hui, le tabagisme tend à la baisse, mais demeure néanmoins élevé chez certains groupes d'âges. La majorité des Canadiens (60%) ne consomment pas les quantités quotidiennes recommandées de fruits et légumes, environ la moitié (54% des femmes et 44% des hommes) sont physiquement inactifs, près de la moitié (39% des femmes et 56% des hommes) présentent un poids corporel défavorable à la santé et 15% sont obèses.

(Société canadienne du cancer et Institut national du cancer du Canada, 2005). Graduellement, le taux de sédentarité semble diminuer, mais le taux d'excès de poids continue d'augmenter, particulièrement chez les jeunes. La lutte anti-tabac a, jusqu'à présent, permis d'accomplir certains progrès dans la prévention du cancer au Canada. L'application des leçons tirées de l'expérience de la lutte contre le tabagisme à d'autres domaines comme l'alimentation et l'exercice physique pourrait éventuellement se traduire par des gains encore plus importants dans la prévention du cancer (Santé Canada, 2004).

1.1.3 Traitements actuellement utilisés au Canada

Les outils actuellement utilisés dans le traitement du cancer sont la chirurgie, la médication anti-cancéreuse ou chimiothérapie et l'utilisation des radiations ou la radiothérapie (Société Canadienne du Cancer, 2003). Souvent, deux de ces méthodes sont nécessaires au traitement du cancer, et parfois les trois doivent être utilisées afin de combattre la maladie.

La chimiothérapie correspond à un traitement systémique et non pas local, c'est-à-dire que les médicaments utilisés sont distribués dans tout l'organisme par voie sanguine. C'est pourquoi la chimiothérapie est utilisée pour lutter, par exemple, contre les cancers de type leucémie (cancer de la moelle osseuse) et lymphomes (cancer du système lymphatique), et pour détruire les cellules métastatiques qui se sont disséminées dans l'organisme, loin de la tumeur primaire (Société Canadienne du Cancer, 2003). Un seul ou plusieurs agents chimiothérapeutiques peuvent être administrés simultanément de manière à obtenir l'effet désiré, et de nos jours, une cinquantaine de médicaments de chimiothérapie sont utilisés. Quoique ces médicaments s'attaquent davantage aux cellules cancéreuses, les agents anticancéreux touchent également les cellules saines de l'organisme, ce qui constitue les principaux effets secondaires du traitement. Bien que certains agents utilisés en chimiothérapie démontrent une efficacité certaine, le développement de plus en plus fréquent de tumeurs multi-résistantes aux drogues cliniques présente un obstacle de taille dans l'utilisation des ces outils dans le futur (Holm *et al.*, 2004).

La radiothérapie, quant à elle, montre une efficacité optimale au niveau d'une tumeur solide localisée, qui est directement accessible par les rayons X. Le principe de la radiothérapie est sensiblement le même que pour les agents de chimiothérapie, soit empêcher les cellules de se diviser, mais cette fois non pas à l'aide d'un agent chimique mais plutôt des rayons X. Tout comme les agents chimiothérapeutiques, les rayons X entraînent la mort de cellules saines, ce qui constitue le principal effet secondaire de ce traitement (Société Canadienne du Cancer, 2003).

1.1.4 Traitements en développement

Depuis quelques années maintenant, plusieurs gènes impliqués dans le développement du cancer ont été identifiés et caractérisés, ce qui en fait des cibles intéressantes pour des traitements éventuels. De plus, les progrès relativement récents dans les domaines tels génétique des tumeurs, biologie des tumeurs et immunologie des tumeurs ont renouvelé l'intérêt dans le développement de "vaccins anti-tumoraux" au sens large (Goedegebuure et Eberlein, 1997). Ces nouveaux vaccins contiennent des peptides ou des gènes ayant une fonction connue et bien définie. Jusqu'à ce jour, des vecteurs viraux et non viraux ont été explorés comme véhicules pour la thérapie génique contre le cancer (Goedegebuure et Eberlein, 1997). Les deux types de vecteurs ont démontré des résultats encourageants chez les modèles animaux. En 1990, après une première démonstration de l'efficacité de la thérapie génique pour corriger une déficience de l'adénosine déaminase, la première thérapie génique en essais cliniques de phase I, visant à traiter des patients atteints de mélanome, a été réalisée. Les résultats de cette étude démontraient que le transfert de gène chez des patients, via des vecteurs rétroviraux, était possible et efficace. Dès cet instant, de nombreuses soumissions de protocoles relatifs au traitement du cancer par la thérapie génique et les vecteurs viraux ont eu lieu, d'abord dans le domaine des mélanomes, puis pour les carcinomes ovariens, les sarcomes, les tumeurs du cerveau et le cancer du poumon (Romano *et al.*, 1998). Jusqu'à maintenant, ces méthodes novatrices de traitement du cancer en sont encore au stade expérimental, mais il n'est pas impossible que celles-ci viennent remplacer un jour les méthodes actuellement utilisées.

1.2 L'apoptose

Durant la dernière décennie, le domaine de la recherche sur l'apoptose a connu un essor remarquable, avec plus de 10 000 articles publiés directement sur la compréhension des protéases de type Ced-3, maintenant connues sous le nom des caspases, et plus de 70 000 articles sur la compréhension en général du phénomène de la mort cellulaire programmée (Yuan et Horvitz, 2004). Contrairement aux travaux détaillés de biologie moléculaire et cellulaire concernant la prolifération et le cycle cellulaire, la compréhension de l'initiation de la mort par apoptose et des mécanismes impliqués dans ce processus, en est presque à ses débuts. La mort cellulaire implique des processus qui sont égaux en complexité et en régulation à ceux impliqués dans la prolifération cellulaire. L'apoptose a d'abord été définie par Kerr (1972) comme la séquence ordonnée et caractéristique de changements structuraux résultant en la mort programmée de la cellule. La séquence temporelle des événements impliqués dans l'apoptose comprend l'induction par un stimuli, l'agrégation de la chromatine à la paroi de la membrane nucléaire, la condensation cytoplasmique et nucléaire et la fragmentation éventuelle de la cellule en un agrégat de segments membranaires (corps apoptotiques), qui contiennent fréquemment des organelles intactes comme la mitochondrie par exemple. En fait, la mort cellulaire programmée est requise, dans diverses situations, pour détruire les cellules représentant une menace à l'intégrité de l'organisme. Par exemple, les cellules infectées par un virus peuvent être détruites par les lymphocytes T cytotoxiques, qui ont la capacité d'induire l'apoptose ; toutefois, certains virus possèdent des contre-mesures pour pallier à ce mécanisme de défense. L'apoptose permet aussi, à mesure que l'immunité à médiation cellulaire diminue lors d'une réponse immunitaire, d'éliminer les cellules effectrices afin de prévenir une éventuelle attaque de leur part sur les divers constituants corporels. Ainsi, les lymphocytes T cytotoxiques induisent l'apoptose l'un sur l'autre et même parfois sur eux-mêmes. Un défaut dans ce mécanisme d'élimination des cellules immunitaires peut être associé à diverses maladies auto-immunes. L'apoptose est également nécessaire afin d'éliminer les cellules ayant subi des dommages irréparables à l'ADN et pouvant éventuellement causer le cancer. Ainsi, les cellules répondent aux dommages causés à leur génome et augmentent la production de la protéine p53, qui est un puissant inducteur de nombreuses autres molécules impliquées dans l'apoptose. C'est l'équilibre entre les

signaux positifs et négatifs reçus par la cellule qui fera en sorte que celle-ci amorcera ou non l'apoptose. Les signaux négatifs sont multiples et peuvent se présenter sous la forme d'oxydants cellulaires pouvant causer atteinte à l'ADN, des rayons ultra-violet, des rayons X ou même certains médicaments utilisés en chimiothérapie. De plus, il existe des molécules qui ont la capacité de se lier à des récepteurs spécifiques sur la surface cellulaire et d'induire un signal indiquant à la cellule d'initier le programme de mort cellulaire. Ces activateurs de mort incluent le TNF- α qui se lie au récepteur TNF-R, et FasL qui se lie à un autre récepteur de surface appelé Fas. Ainsi, il y a plusieurs mécanismes par lesquels une cellule peut être amenée à déclencher le programme de mort cellulaire. Certains impliquent des signaux provenant de l'intérieur de la cellule, alors que d'autres sont engendrés par les activateurs de mort se liant à des récepteurs à la surface de la cellule (Shi, 2002).

1.2.1 Apoptose versus Nécrose

La mort nécrotique est une réponse à des changements pathologiques initiés à l'extérieur de la cellule et elle peut être induite par une large série de facteurs, résultant en un changement de perméabilité de la membrane plasmique. Cette augmentation de la perméabilité membranaire de la cellule provoque la lyse osmotique de la cellule. Durant la mort cellulaire nécrotique, la cellule a un rôle passif dans l'initiation des signaux qui engendrent sa mort; tandis que lors de la mort cellulaire programmée, la cellule utilise un processus énergie-dépendant de mort cellulaire initié par des signaux spécifiques, la cellule joue un rôle actif (Kerr *et al.*, 1972 ; Arends *et al.*, 1990). La mort cellulaire programmée est un phénomène très répandu, qui survient de manière tout à fait normale à différents stades de la morphogenèse, durant la croissance et le développement des organismes métazoaires. Une fois initiée, la mort cellulaire programmée mène à une cascade d'événements biochimiques et morphologiques précis, qui résultent en une dégradation irréversible de l'ADN génomique et la dégradation de la cellule. La voie morphologique de la mort cellulaire programmée a été nommée apoptose, pour distinguer ce processus de la mort nécrotique (Kerr *et al.*, 1972 ; Arends *et al.*, 1990).

1.2.2 Voie d'activation intrinsèque de l'apoptose

L'apoptose peut être déclenchée par des signaux cellulaires internes : on parle alors de la voie intrinsèque d'activation de l'apoptose ou la voie mitochondriale (Shi, 2002). Cette voie est complexe et engendre une panoplie de protéines différentes qui interagissent ensemble, dont certaines ont une fonction de clivage permettant d'activer d'autres protéines et de compléter le programme de mort cellulaire. Chez une cellule saine, la protéine Bcl-2 est présente à la surface de la membrane externe de la mitochondrie. L'expression de cette protéine empêche la mort prématurée des cellules, car Bcl-2 inhibe l'apoptose en prévenant l'activation des caspases responsables du processus de mort cellulaire. Effectivement, au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, Bcl-2 est liée à une molécule nommée Apaf-1, et l'interaction des deux protéines empêche Apaf-1 d'exercer sa fonction activatrice. Toutefois, lorsque survient un dommage interne à la cellule, la protéine p53 a la capacité de favoriser la transcription de plusieurs gènes pro-apoptotiques dont Bax. L'expression élevée de la protéine Bax engendre la formation de pores au niveau de la membrane mitochondriale et le relargage du cytochrome c à l'extérieur de celle-ci. Le cytochrome c provoque dès lors le détachement du complexe Bcl-2/Apaf-1 et mène à l'activation du programme de mort cellulaire.

Ainsi, l'action de la protéine Bax au niveau de la mitochondrie et le relargage du cytochrome c sont suffisants pour provoquer la séparation de Bcl-2 et Apaf-1, causant ainsi la libération de Apaf-1 dans le cytosol. Généralement, Apaf-1 existe sous la forme de monomère, mais en présence du cytochrome c et d'ATP/dATP, Apaf-1 forme un complexe appelé l'apoptosome (Li *et al.*, 2004 ; Shi, 2002). En fait, le cytochrome c, en se liant aux séquences répétées WD40 de Apaf-1, génère un changement de conformation qui ouvre la molécule, et la liaison d'ATP au domaine CARD permet la multimérisation de Apaf-1 et l'association à la pro-caspase 9 dans le cytosol (Cain *et al.*, 2002). Le domaine CARD de Apaf-1 recrute spécifiquement celui de la pro-caspase 9 par complémentarité de charge au niveau des surfaces (Adams et Cory, 2002 ; Shi, 2002). La caspase 9 fait partie d'une famille d'une douzaine de protéines appelées caspases, qui sont les principales effectrices de l'apoptose. Ces protéines sont toutes des cystéines protéases existant dans la cellule sous la

forme inactive ou pro-forme et ayant une activité au niveau des résidus d'acide aspartique. Elles clivent leurs caspases homologues ou d'autres caspases, et ce faisant les activent. Donc, une fois la caspase 9 activée, celle-ci a la capacité de recruter et de cliver les pro-caspases 7 et 3 et d'initier la cascade des caspases menant irréversiblement à l'apoptose.

1.2.3 Voie d'activation extrinsèque de l'apoptose

En plus de la voie intrinsèque d'induction de l'apoptose, il existe la voie dite extrinsèque, qui est déclenchée par les récepteurs de mort cellulaire via des stimuli externes. Un ligand tel que Fas, ou les récepteurs TNF et TRAIL induisent la trimérisation et la formation de complexes signalant l'induction de la mort cellulaire. Ces complexes, localisés au niveau de la membrane cellulaire, recrutent par la suite la pro-caspase 8, via des molécules adaptatrices telles que FADD, et induisent un changement de conformation de la pro-caspase 8, qui résulte en le clivage et l'activation de cette dernière (Thorburn, 2004). La caspase 8, une caspase initiatrice, peut alors activer les caspases effectrices responsables des événements irréversibles menant à l'apoptose (Cain *et al.*, 2002). La voie extrinsèque a également la capacité d'activer la voie intrinsèque de l'apoptose, via l'activation de la protéine Bid par la caspase 8. En effet, une fois clivée, la protéine Bid a la capacité de former des pores au niveau de la membrane mitochondriale en s'associant à Bax afin de provoquer le relargage du cytochrome c et engendrer ainsi l'activation de la voie des caspases menant à l'apoptose.

1.2.4 Processus des événements associés à l'apoptose

Que ce soit via la voie intrinsèque ou extrinsèque d'induction de l'apoptose, une fois la cascade des caspases initiée, des changements morphologiques et biochimiques importants surviennent dans la cellule. Effectivement, à la suite de l'activation des caspases, il y a agrégation de la chromatine à la membrane nucléaire, et la dégradation de l'ADN survient dans les régions riches en A/T. Des fragments de 50 à 300 paires de bases sont d'abord produits (Brown *et al.*, 1993), puis apparaissent des fragments de 180 à 200 paires de bases, caractéristiques des régions internucléosomales (Wyllie, 1987). La

dégradation de l'ADN chez les cellules en apoptose est menée à bien par la protéine CAD, qui en conditions normales est complexée et inhibée par ICAD dans le cytosol. Une fois la cascade des caspases enclenchée, les caspases 3 et 7 clivent le complexe protéique, pour ainsi libérer CAD, qui migre alors vers le noyau et dégrade l'ADN (Danial et Korsmeyer, 2004). D'autres événements sont observés durant la phase de changements morphologiques, dont le bourgeonnement de la cellule et la désorganisation du cytosquelette. Effectivement, l'activation des caspases résulte au clivage, par les caspases 3 et 7, de nombreuses protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire et la régulation du cytosquelette, incluant la Gelsoline, la α -Fodrine, la β -caténine, la E-cadhérine ainsi que l'actine. Une fois clivée par les caspases, la Gelsoline active clive à son tour l'actine, une protéine d'importance capitale dans le cytosquelette (Thornberry et Lazebnik, 1998). La protéolyse de la α -Fodrine compromet sérieusement l'organisation des microfilaments, ce qui pourrait être à l'origine du bourgeonnement (Veselska *et al.*, 2003). D'un autre côté le clivage de la β -caténine interrompt les réactions d'adhésion cellule-cellule, isolant ainsi la cellule en apoptose des cellules avoisinantes (Wolf et Green, 1999). Les caspases agissent aussi au niveau de la signalisation intracellulaire par l'activation ou le clivage de certaines protéines kinases dont PAK-2, MAPK et MEKK-1, engendrant ainsi la translocation de celles-ci et la perte de leur activité (Porter, 1999). La suite de ces événements génère les corps apoptotiques, qui sont rapidement éliminés afin de prévenir la libération des débris intracellulaires et l'inflammation (Hoffmann *et al.*, 2001). La phase initiale du programme mène donc à la formation des corps apoptotiques, et celle-ci est suivie par l'étape tout aussi importante d'élimination de ces derniers par phagocytose, qui constitue l'objectif ultime du programme de mort cellulaire (Ravichandran, 2003 ; Aderem, 2002). Les cellules en apoptose utilisent certains signaux de recrutement afin d'attirer et d'être reconnues par les phagocytes.

1.3 Le Virus de la Stomatite Vésiculaire (VSV)

Le Virus de la Stomatite Vésiculaire fait partie d'une des plus grandes familles de virus connues, les *Rhabdoviridae*. On compte officiellement cinq genres de *Rhabdovirus* dont deux principaux, les *Lyssavirus* (virus apparentés au virus de la rage) et les *Vésiculovirus*

(virus apparentés au VSV). Comme tous les virus de la famille des *Rhabdoviridae*, le VSV a la forme particulière d'une balle de fusil. Il est constitué de deux composants principaux, une ribonucléoprotéine hélicoïdale, ainsi qu'une enveloppe lipidique la recouvrant, faisant de celui-ci un virus enveloppé. Le VSV a la capacité d'infecter de nombreux animaux tels les bovins, les porcs, certains rongeurs et les chevaux par le biais de vecteurs arthropodes comme les insectes. L'infection produit des lésions ulcéreuses au niveau de la muqueuse buccale et du pharynx, et il arrive parfois que l'humain devienne aussi un hôte accidentel du virus (Ferran et Lucas-Lenard, 1997 ; Letchworth *et al.*, 1999). Deux sérotypes principaux du Virus de la Stomatite Vésiculaire sont connus, soient Indiana et New Jersey, qui comptent chacun quelques sous-représentants (Letchworth *et al.*, 1999).

1.3.1 Structure du Virus de la Stomatite vésiculaire

Le VSV (Figure 1) est un virus enveloppé possédant un génome d'ARN monocaténaire non segmenté à polarité négative de 11 kb, au sein duquel cinq gènes sont présents de l'extrémité 3' vers 5' (Letchworth *et al.*, 1999). Devant les cinq gènes, à l'extrémité 3', se trouve une séquence *Leader* de 47 nucléotides qui n'est pas traduite, suivie de trois nucléotides (AAA) séparant le *Leader* du premier gène. À l'autre extrémité, en 5', se trouve une séquence non codante, nommée séquence *Trailer*, d'une longueur de 59 nucléotides. La séquence 3'-*Leader* joue le rôle de promoteur dans la transcription des ARN_m viraux, mais agit aussi comme promoteur lors de la réplication menant à l'anti-génome de polarité positive. L'extrémité 3' du brin positif anti-génome, qui est le complément des 59 nucléotides génomiques du 5'-*Trailer*, agit comme promoteur lors de la réplication des génomes de polarité négative. La séquence *Leader* est donc utilisée comme promoteur lors de deux processus distincts de synthèse d'ARN, la transcription des ARN_m viraux et la réplication du génome, alors que la séquence *Trailer* agit seulement comme promoteur lors de la réplication (Whelan et Wertz, 1999). Les cinq transcrits d'ARN sens polyadénylés codent pour les cinq protéines virales du VSV. L'expression génique du VSV est à la fois séquentielle et polaire, et il n'y a qu'un seul site d'entrée de l'ARN polymérase. Ce site unique d'initiation transcriptionnelle, en position 3' du génome, implique que les gènes en amont sont transcrits avant les gènes en aval. Les cinq protéines sont ainsi exprimées en

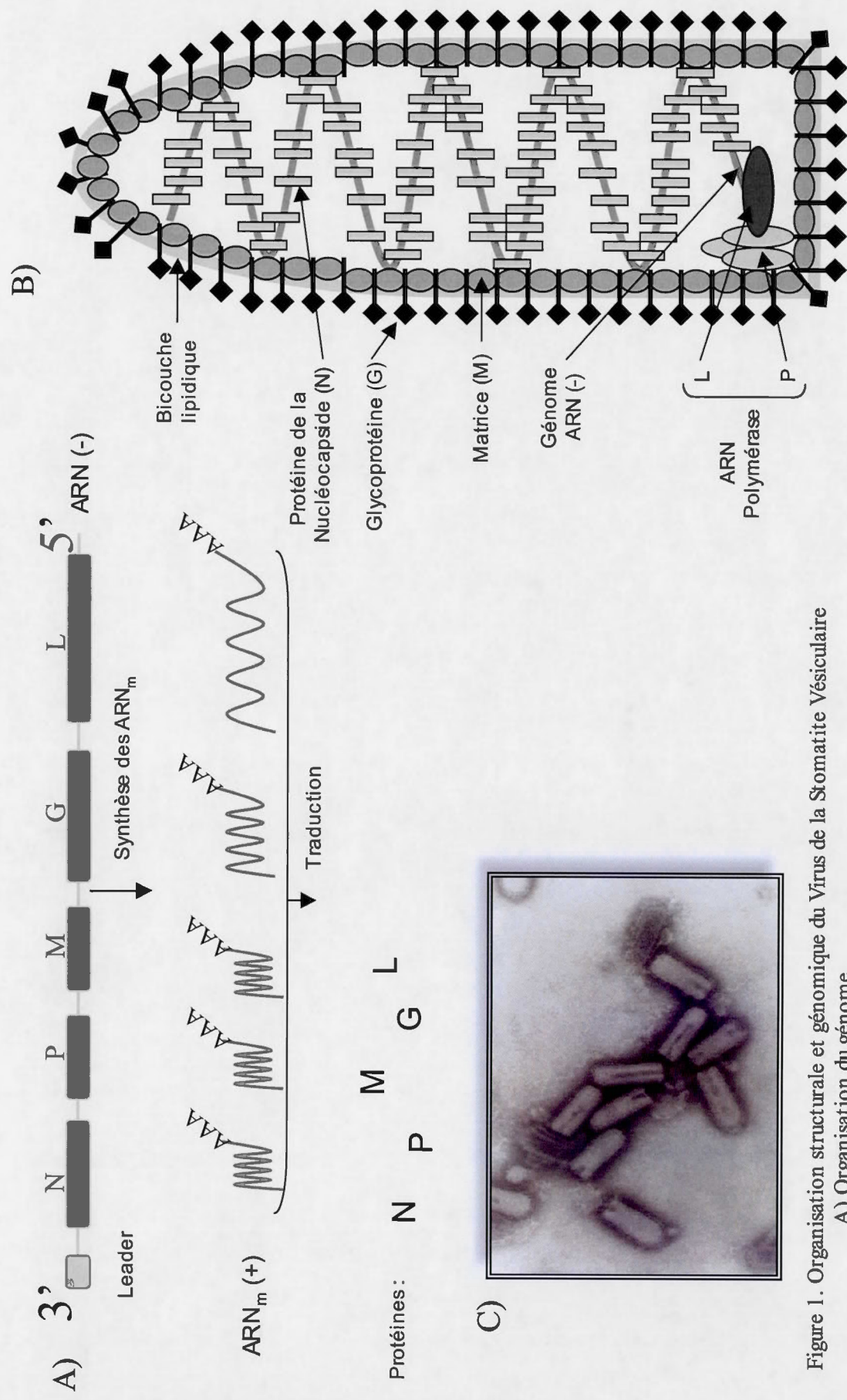


Figure 1. Organisation structurale et génomique du Virus de la Stomatite Vésiculaire

A) Organisation du génome

B) Représentation schématique de la structure d'un virion

C) Particule virale en microscopie électronique en coloration négative, l'axe longitudinal d'un virion $\approx 180\text{nm}$

quantité proportionnelle à l'abondance de leurs ARN_m respectifs, qui suit l'ordre des gènes sur le génome viral (N > P > M > G > L) (Stillman et Whitt, 1997). Des séquences signal agissant en *cis*, étant impliquées à la fois dans la terminaison et la polyadénylation d'un ARN_m situé en amont et dans la réinitiation de la transcription du gène suivant, ont été identifiées à toutes les jonctions intergéniques. Ainsi, chacun des gènes du VSV contient une séquence conservée de commencement du gène en 3' et une séquence conservée de terminaison du gène en 5'. La jonction entre deux gènes consiste donc en une séquence de 23 nucléotides : 3'-AUAC UUUUUUU G/CA UUGUCnnUAG-5' (où n est un nucléotide non conservé) (Hinzman *et al.*, 2002). Le signal de terminaison et de polyadénylation est constitué des 13 premiers nucléotides, incluant la séquence de terminaison du gène 3'-AUAC UUUUUUU-5' et la séquence intergénique dinucléotidique 3'-G/CA-5'. Cette dernière joue un rôle à la fois dans la terminaison et l'initiation de la transcription des ARN_m. En ce qui concerne le signal d'initiation de la transcription, il est quant à lui constitué de la séquence de commencement du gène 3'-UUGUCnnUAG-5'.

Le génome viral est étroitement associé à la nucléoprotéine (N), à la large protéine (L) et à la phosphoprotéine (P) pour former la nucléocapside. Ensemble, les protéines L et P forment l'ARN polymérase ARN-dépendante impliquée dans la transcription du génome en ARN_m viraux, ainsi que dans la réplication du génome viral (Black *et al.*, 1993 ; Black *et al.*, 1994). Une protéine glycosylée, la protéine (G), est intégrée à l'enveloppe virale et représente l'antigène majeur du virus permettant son adsorption à la surface des cellules hôtes. Finalement, la protéine matricielle (M), a un rôle dans la condensation et l'ancrage de la ribonucléoprotéine à la membrane plasmique et la cohésion dans l'assemblage des virions. Il a été démontré cependant que la protéine M joue un rôle multifonctionnel, c'est-à-dire qu'en plus de ses rôles dans l'assemblage et la condensation de la nucléocapside, M est impliquée aussi dans la pathogénèse cellulaire (Black *et al.*, 1993 ; Black *et al.*, 1994).

1.3.2 Protéine M et pathogénèse cellulaire

Un des plus petits produits encodés par le génome de VSV est la protéine de la matrice, qui fait seulement 229 acides aminés. Cette protéine joue des rôles très diversifiés et

cruciaux lors de la réplication, mais elle est aussi impliquée dans la pathogénèse du virus, un aspect particulier qui attire l'attention. D'abord, parmi les effets cytopathiques rencontrés, la protéine M a la capacité de provoquer l'arrondissement cellulaire, en partie via son interaction directe avec la tubuline du cytosquelette cellulaire (Melki *et al.*, 1994 ; Lyles et McKenzie, 1997). Le domaine fonctionnel de la protéine M, ayant pour effet de provoquer l'arrondissement des cellules hôtes, se situe dans la portion C-terminale de celle-ci, au niveau des acides aminés 173 à 229 (Blondel *et al.*, 1990). Il a aussi été démontré que l'arrondissement cellulaire provoqué par l'expression de la protéine M était relié à l'induction de l'apoptose (Kopecky et Lyles, 2003).

Un autre effet cytopathique de la protéine M est l'inhibition de la transcription des gènes de l'hôte (Kopecky et Lyles, 2003) par la paralysie de l'activité des ARN polymérases I, II et III, et ce même en absence de tous les autres composants viraux (Ahmed et Lyles, 1998). Les gènes transcrits par l'ARN polymérase II sont davantage sensibles aux effets de l'infection par le VSV que ceux transcrits par les ARN polymérases I et III, et cette inhibition de la transcription n'a pas de spécificité de promoteurs. L'effet inhibiteur de la protéine M sur l'ARN polymérase implique l'inactivation indirecte du facteur de transcription TFIID (Yuan *et al.*, 2001), un complexe de plusieurs sous-unités consistant en une unité se liant à l'ADN, soit la protéine appelée TBP et d'autres protéines nommées TAF. Le facteur de transcription TFIID est le premier à s'associer aux promoteurs de l'ARN polymérase II par la liaison de la protéine TBP à la boîte TATA, une séquence d'ADN située en amont de la plupart des promoteurs. La protéine TBP est la seule sous-unité de TFIID requise pour initier une transcription basale *in vitro*. Il est également reconnu que l'inhibition de la polymérase II par la protéine M pourrait être causée par une interférence dans la régulation de la protéine TBP (Yuan *et al.*, 2001). Le domaine fonctionnel de la protéine M, ayant pour effet de provoquer l'inhibition de la transcription des gènes cellulaires, correspond aux mêmes acides aminés que ceux impliqués dans le phénomène de l'arrondissement des cellules hôtes, se situant dans la portion C-terminale de la protéine, au niveau des acides aminés 173 à 229 (Paik *et al.*, 1995).

L'interruption du programme de transcription cellulaire par M est amplifiée et causée, en partie, par l'inhibition de l'exportation des ARN_m en provenance du noyau via l'interaction de la protéine M avec Nup98, une nucléoporine (Peterson *et al.*, 2000 ; von Kobbe *et al.*, 2000). Les premières observations démontrant que la protéine M inhibe le transport nucléocytoplasmique proviennent d'études sur des oocytes de *Xenopus laevis*, chez qui l'expression de la protéine M a résulté en une diminution dramatique de l'exportation des ARN_{pn}, ARN_r et ARN_m vers le cytoplasme et de l'importation de protéines et ARN_{pn} vers le noyau (Her *et al.*, 1997). Cependant, la protéine M ne bloque pas le transport des ARN_r vers le cytoplasme. Ces effets inhibiteurs de M sur le transport nucléaire résultent en fait de l'interférence avec le transport dépendant du système RanGTPase (Her *et al.*, 1997), responsable du transport nucléocytoplasmique actif (Gustin, 2003). Le rôle de la protéine matricielle dans l'inhibition du transport nucléocytoplasmique semble, entre autre, être de bloquer l'expression de certains produits antiviraux comme l'interféron bêta, facilitant ainsi la réplication virale (Ferran et Lucas-Lenard, 1997). Le domaine fonctionnel de la protéine M, ayant pour effet de provoquer l'inhibition du transport nucléocytoplasmique, se situe dans la portion N-terminale de celle-ci au niveau des acides aminés 51 à 59 (Peterson *et al.*, 2000 ; von Kobbe *et al.*, 2000 ; Gustin, 2003). Il a aussi été démontré que la protéine M contribue à la cytopathogénèse par son habileté à provoquer l'apoptose en présence et en absence des autres protéines virales (Kopecky *et al.*, 2001 ; Gadaleta *et al.*, 2002). Il semble plutôt clair que les effets cytopathiques causés par la protéine M sont reliés entre eux, mais il reste néanmoins certaines zones sombres dans la compréhension exacte de tous les mécanismes impliqués dans les effets cytopathiques énumérés ci-haut. L'aspect pro-apoptotique du produit du gène M représente le caractère le plus attrayant pour le présent projet, car cette propriété peut représenter un outil intéressant dans la perspective de l'utilisation du gène M comme gène suicide.

Il existe plusieurs variants du VSV, dont certains portent une mutation au niveau de la protéine virale M, alors que d'autres présentent des mutations ailleurs dans leur génome. Certains des variants mutants dans le gène M n'ont pas la même capacité à inhiber la transcription cellulaire et à provoquer l'apoptose (Desforges *et al.*, 2001 ; Desforges *et al.*, 2002). Les deux variants utilisés lors de cette étude sont T1026 et TP6, qui sont différents

dans les effets cytopathiques qu'ils provoquent. Ainsi, le variant VSV T1026 porte une mutation dans la portion N-terminale du gène M (M_{51R}), qui consiste en la substitution d'une méthionine en une arginine en position du 51^{ème} acide aminé. Cette mutation confère à cette protéine M une capacité réduite à inhiber la synthèse protéique, de même qu'une induction moins rapide de l'apoptose par rapport à la protéine M du virus sauvage. Pour ce qui est du variant TP6 (Francoeur *et al.*, 1987), il ne possède aucune mutation au niveau de la protéine M, mais montre une inhibition de la synthèse protéique plus élevée encore que le virus sauvage, impliquant qu'il est aussi efficace sinon plus que le VSV_{wt} en ce qui concerne l'inhibition de la transcription et l'induction de l'apoptose.

Dans le contexte de la présente étude, c'est la capacité de la protéine M à induire l'apoptose qui représente un intérêt. Effectivement, puisque M peut induire l'apoptose en absence des autres protéines virales (Kopecky *et al.*, 2001), cette protéine représente un outil intéressant pour induire la mort de cellules indésirables, comme par exemple des cellules transformées. D'ailleurs, le VSV est actuellement utilisé dans des études *in vivo* pour ses propriétés pro-apoptotiques. Effectivement, VSV_{wt} et différents VSV recombinants ont été créés et sont utilisés *in vitro* et *in vivo* afin d'évaluer l'efficacité du virus à provoquer l'apoptose chez des cellules cancéreuses, déficientes dans la production d'interféron bêta, un agent antiviral naturel exprimé par les cellules saines en contexte d'infection virale (Balachandran *et al.*, 2001 ; Fernandez *et al.*, 2002 ; Obuchi *et al.*, 2003 ; Stojdl *et al.*, 2003).

1.4 Vecteurs de thérapie génique

En 1990, le premier essai clinique de thérapie génique a été réalisé dans le cadre de la déficience en adénosine déaminase, un syndrome combiné d'immunodéficiência. Depuis, plus de 5000 patients ont été traités à travers le monde dans le cadre de plus de 400 protocoles de thérapie génique clinique (Rochlitz, 2001). À l'exception d'un seul cas mortel, survenu chez un jeune garçon en 1999 (Hollon, 2000), les effets secondaires des différentes thérapies utilisées se sont avérés rares et généralement légers, et l'expression du transgène a pu être démontrée *in vivo*. Afin d'éliminer les risques potentiels du transfert de gènes *in vivo*, comme l'introduction de transformations malignes ou l'évolution de nouvelles maladies virales chez

l'homme, le développement de vecteurs ayant un haut degré de sécurité est nécessaire. De plus, la clé d'un éventuel succès de thérapie génique repose sur la disponibilité de véhicules de transfert ayant une efficacité de transduction *in vivo* supérieure aux outils actuellement utilisés en essais cliniques. Des méthodes non-virales et virales de transfert de gènes sont présentement utilisées, tant *in vitro* qu'*in vivo*.

1.4.1 Méthodes non-virales de transfert de gène

Les méthodes non-virales de transfert de gènes sont nombreuses et particulièrement attirantes parce qu'elles permettent d'éviter les risques potentiels associés aux vecteurs viraux. Parmi ces méthodes, l'utilisation des liposomes qui remonte à 1987, a été utilisée à plusieurs reprises *in vitro*, de même que dans certaines études *in vivo* chez des animaux et des humains. Les liposomes représentent un réactif très utilisé, encore aujourd'hui, afin d'introduire de l'ADN dans une cellule. L'ajout de lipides cationiques à de l'ADN plasmidique diminue sa charge négative et facilite son interaction avec les membranes cellulaires. Généralement, des lipides neutres ou du cholestérol sont ajoutés au mélange ADN/liposomes, afin de faciliter le relargage de l'ADN plasmidique après l'endocytose. Une grande quantité de lipides cationiques divers ont été utilisés à ce jour afin de procéder à des transferts de gènes (Niidome et Huang, 2002). Cette méthode a été utilisée avec succès pour transférer de l'ADN plasmidique dans des poumons, le cerveau et la peau par administration locale. Certains complexes ADN/liposomes ont même été utilisés dans des essais cliniques pour le traitement du cancer et de la fibrose kystique (Nishikawa et Huang, 2001). Bien que les liposomes aient montré certains succès et qu'ils ne représentent pas vraiment un risque élevé pour la santé, cette méthode ne permet pas d'atteindre une efficacité de transduction très élevée et ne possède pas de spécificité cellulaire, ce qui réduit son utilisation.

L'injection d'ADN nu est le système de transfert d'ADN le plus simple et le plus sécuritaire de tous. Alors que plusieurs croyaient qu'il n'était pas possible de transférer de l'ADN sans utiliser un vecteur, Wolff *et al.* (1990) ont rapporté que l'expression génique dans le muscle squelettique pouvait être atteinte par une simple injection intramusculaire d'ADN plasmidique. Jusqu'à maintenant, l'injection directe d'ADN a été réalisée avec succès

au niveau du muscle squelettique, du foie, de la thyroïde, du muscle cardiaque, du cerveau et de la peau (Nishikawa et Huang, 2001 ; Niidome et Huang, 2002). L'ADN est ainsi injecté directement dans l'espace interstitiel de l'organe ciblé. Il a également été rapporté que l'injection intra-tumorale d'ADN ne pouvait permettre l'expression du transgène à un niveau suffisant pour engendrer un effet thérapeutique. Bien que cette méthode soit stable, elle ne permet pas d'atteindre un niveau élevé de transduction des cellules, environ 1% seulement, et ne présente pas non plus de spécificité cellulaire. Cependant, cette méthode a l'avantage que l'ADN est facile à préparer en grande quantité et à purifier.

Une autre méthode non-virale de transfert de gène est l'utilisation d'un canon à gène. Cette méthode consiste à recouvrir des particules d'or avec l'ADN qui doit être transfecté, et à bombarder cet ADN plasmidique sur le tissu désiré. Le bombardement de l'ADN permet une pénétration directe de la membrane cellulaire vers le cytoplasme et même le noyau, évitant ainsi de transiter par les endosomes/lysosomes et réduisant donc les risques de dégradation du transgène transféré. Jusqu'à maintenant, des essais de transfert de gènes codant pour des antigènes ou des cytokines ont été réalisés avec succès directement sur la peau, les muscles et le foie, dans des contextes de vaccination et d'immunothérapie respectivement. L'efficacité de transfection de l'ADN varie d'un tissu à l'autre, de 10 à 20% chez les cellules épidermales de la surface bombardée pour la peau et de 1 à 5% pour les cellules musculaires (Nishikawa et Huang, 2001). L'expression du transgène, au niveau du foie et de la peau chez la souris, peut durer jusqu'à environ deux semaines après le bombardement. Il existe cependant un désavantage majeur à cette méthode, soit la pénétration en profondeur de l'ADN bombardé dans le tissu ciblé. Effectivement, il a été rapporté, que chez le muscle squelettique, la pénétration des particules n'excède pas 0,5 mm. Bien qu'*in vivo*, l'utilisation du canon à gène résulte en une expression faible du transgène et de courte durée, cette méthode pourrait être envisagée à des fins de vaccination génétique.

L'électroporation constitue une autre méthode non-virale de transfert de gène pouvant être utilisée aujourd'hui. L'application d'une courte pulsation électrique de forte intensité permet de perméabiliser de manière réversible les membranes cellulaires, permettant ainsi aux molécules extracellulaires de pénétrer à l'intérieur des cellules. Cette technique est

utilisée *in vitro* depuis 1982 pour la transfection de cultures cellulaires (Neumann *et al.*, 1982). L'électroporation *in vivo* utilise, lors d'un transfert de gène, de l'ADN plasmidique nu comme molécule de départ. L'application des pulsations électriques provoque l'ouverture de pores au niveau des membranes cellulaires du tissu ciblé, par lesquels l'ADN peut passer à l'intérieur des cellules selon un gradient de concentration. Une fois la perméabilisation terminée, les pores se referment et l'ADN est emprisonné dans les cellules (Nishikawa et Huang, 2001). Jusqu'à présent, cette technique a été utilisée pour introduire de l'ADN plasmidique dans des tissus comme la peau, le foie et les muscles. L'ADN nu est d'abord injecté dans l'espace interstitiel des tissus ciblés et les pulsations électriques sont appliquées à l'aide d'une aiguille ou d'électrodes. La peau représente un tissu de choix pour cette technique et l'électroporation a été utilisée avec succès dans des essais cliniques de phase I/II dans le traitement du mélanome, avec certains médicaments non perméables injectés par voie intra-tumorale. Les pulsations électriques augmentent généralement l'expression génique de 1000 fois, comparativement à l'injection d'ADN nu sans électroporation (Nishikawa et Huang, 2001). En plus d'augmenter la durée de l'expression du transgène, cette méthode permet d'obtenir une distribution plus large de cellules transfectées. Le principal désavantage de cette technique réside dans l'optimisation des paramètres de l'électroporation *in vivo*, qui varient selon les tissus ciblés. D'autres méthodes de transfert de gènes non virales existent, mais ne sont utilisables qu'*in vitro*; celles-ci comprennent la précipitation au calcium-phosphate et la microinjection intracellulaire d'ADN entre autres.

Bien que les méthodes non-virales de transfert de gène montrent certains succès, tant *in vitro* qu'*in vivo*, l'application clinique des vecteurs non-viraux repose dorénavant sur une meilleure compréhension des paramètres impliquées dans le transfert de gène et sur le développement de vecteurs pouvant surmonter celles-ci. Parmi les barrières impliquées, on peut mentionner les propriétés physico-chimiques des vecteurs utilisés (ADN, Liposomes, etc.), l'interaction des vecteurs avec certains composants du sang lors d'injections intra-veineuses, la reconnaissance des vecteurs par le système immunitaire, le relargage endosomal pour les vecteurs transitant par endocytose, l'efficacité et la spécificité de transfection des cellules cibles, la stabilité des vecteurs dans le cytoplasme et l'importation de ceux-ci vers le noyau. Des progrès ont été réalisés depuis les années 1990 et il n'est pas exclu que certaines

techniques non virales de transfert de gène soient utilisées en pratique clinique dans un avenir pas si lointain.

1.4.2 Méthodes virales de transfert de gène

L'idée d'utiliser des virus comme outil de transfert de gènes est tentante pour sa simplicité en principe, mais aussi pour les perspectives illimitées qu'elle laisse entrevoir. Effectivement, les perspectives de thérapies géniques utilisant des vecteurs de type viraux peuvent s'appliquer à de nombreuses maladies comme la fibrose kystique, les désordres de coagulation, les maladies vasculaires, les maladies d'origine génétique et le cancer pour ne nommer que celles là (Dobblestein, 2003). Ainsi, de nombreuses études cliniques de thérapie génique ont utilisé des vecteurs viraux pour le transfert de gène, et plus particulièrement les vecteurs rétroviraux (Wu et Ataai, 2000), comptant pour près de 40% des études en 2000 (Rochlitz, 2001). De nombreux types de virus, incluant les adénovirus, les *adéno-associated virus* (AAV), les herpes simplex virus (HSV), les rétrovirus, les lentivirus, les réovirus, le virus de la Vaccine et le *Newcastle disease virus* ont été modifiés en laboratoire à des fins d'applications en thérapie génique (Robbins et Ghivizzani, 1998 ; Kootstra et Verma, 2003). En raison des avantages et des inconvénients de chaque type de vecteur, chacun d'eux possède son champ d'application respectif.

Les vecteurs adénoviraux sont très utilisés dans le transfert de gènes *in vivo* et les études cliniques portant sur le cancer. Les adénovirus sont des virus à ADN double brin non enveloppés et linéaires, dont le génome fait environ 30 à 35 kbp (Robbins et Ghivizzani, 1998 ; Mullen et Tanabe, 2002). Ces vecteurs ont l'avantage d'avoir la capacité d'infecter les cellules en division et certaines cellules quiescentes. Ils ont une capacité d'insert relativement grande, d'environ 7,5 kbp (Romano *et al.*, 1998) selon la génération de vecteur. Les titres de vecteurs obtenus sont élevés (10^{11} pfu/ml) et ne représentent pas un facteur limitant leur utilisation. Les niveaux d'expression du transgène sont appréciables (Lundstrum, 2003), mais celle-ci demeure transitoire et de courte durée. Il existe, jusqu'à ce jour, trois générations différentes de vecteurs adénoviraux. La première consiste en une délétion du gène E1 du virus, un gène impliqué dans l'expression des autres gènes viraux et dans la réplication,

rendant celui-ci déficient dans sa réplication. La production des vecteurs nécessite une lignée cellulaire exprimant en *trans* le produit du gène E1, telle que la lignée cellulaire 293. La seconde génération de vecteurs adénoviraux possèdent une délétion de certains cadres de lecture ouverts des gènes E2 et/ou E4, et nécessitent une lignée cellulaire produisant en *trans* les protéines virales nécessaires à leur production. Les vecteurs adénoviraux de première et de seconde génération sont très immunogéniques, principalement en raison du fait que des gènes viraux sont toujours présents et faiblement exprimés dans le vecteur, en plus du fait que la majorité de la population a déjà été exposée naturellement à des infections aux adénovirus et a développé une immunité contre ce dernier (Lundstrum, 2003). Cette immunogénicité réduit dès lors la possibilité d'expression à long terme du transgène et rend ces vecteurs peu efficaces pour les thérapies géniques nécessitant l'expression d'un transgène sur une longue période. Récemment cependant, des vecteurs adénoviraux de troisième génération, appelés *gutless*, ont été créés (Robbins et Ghivizzani, 1998 ; Wu et Atai, 2000). Ces vecteurs ont été délestés de tous les gènes viraux, ce qui réduit considérablement leur immunogénicité. Ces vecteurs sont générés dans une lignée cellulaire produisant en *trans* E1 en présence d'un adénovirus *helper* déficient dans la fonction E1, fournissant les autres protéines virales en *trans*. La difficulté de cette technique repose toutefois sur la purification des vecteurs adénoviraux.

Les vecteurs AAV ont établi leur position comme un des plus populaires systèmes de transfert de gènes avec le temps. Les AAV sont des virus à ADN simple brin d'une taille de 5 kpb environ. La réplication de ces virus nécessite une fonction accomplie par un virus *helper*, tel un adénovirus ou un herpes simplex virus. Les avantages de ce système reposent sur une expression à long terme et efficace du transgène dans différents types cellulaires et différents tissus tels le foie, le muscle, la rétine et le système nerveux central (Robbins et Ghivizzani, 1998). Toutefois, tout comme les autres systèmes, certains désavantages à l'utilisation de ces vecteurs existent, comme la capacité d'insert réduite (environ 4 kpb) et la production à grande échelle ardue et inefficace. De plus, au même titre que le vecteur adénoviral, le vecteur AAV présente une immunogénicité chez l'humain. Son principal désavantage réside dans la probabilité que le vecteur s'intègre dans le génome de son hôte, ce qui peut mener à une activation ou à une inhibition subite de l'expression d'un gène endogène.

Des vecteurs dérivés du virus Herpes simplex ont aussi été développés pour certaines applications de thérapie génique. Le virus HSV-1 est un virus ADN double brin enveloppé, dont le génome fait environ 150 kpb, renfermant approximativement 80 gènes viraux. Les vecteurs HSV ont l'avantage d'être capables d'infecter tant les cellules en division que les cellules quiescentes. Ils sont capables d'établir une latence chez certains types cellulaires et ils sont ceux ayant la plus importante capacité d'insertion avec 30 kpb (Mullen et Tanabe, 2002). Cette capacité d'insert fait des vecteurs HSV un outil attirant dans le transfert de plusieurs gènes à la fois et l'utilisation de promoteurs hétérologues ou de systèmes d'expression inductibles complexes. Cet aspect représente un avantage indéniable sur de nombreux autres vecteurs ayant une capacité d'insertion nettement inférieure aux vecteurs HSV. Leur habileté à établir une latence chez les cellules neuronales fait de ce type de vecteur un outil intéressant dans le traitement de maladies neurologiques comme le Parkinson ou l'Alzheimer (Wu et Atai, 2000). De plus, le génome de HSV demeure épisomal après l'infection, ce qui élimine les risques de transformation provoquée par une insertion accidentelle dans le génome de l'hôte. Bien que le génome entier de HSV soit cytotoxique pour les neurones, la délétion de plusieurs gènes viraux peut être effectuée et générer des vecteurs viables. La délétion des quatre gènes précoces ICP0, ICP4, ICP22 et ICP47 résulte en un vecteur entièrement non toxique, qui persiste pour une longue durée chez la cellule hôte, permettant ainsi une expression à long terme du transgène (Lundstrum, 2003). Des systèmes de délétion de gènes et d'utilisation de lignées cellulaires complémentaires semblables aux systèmes adénoviraux pour la production des vecteurs ont été conçus également pour les vecteurs HSV (Robbins et Ghivizzani, 1998). En raison de l'aspect de latence, les vecteurs HSV sont très attrayants pour les applications où une expression élevée à long terme du transgène est nécessaire. Toutefois, dans le cas de la thérapie génique du cancer, où une expression transitoire du transgène est davantage requise, d'autres vecteurs semblent plus appropriés.

Le virus de la vaccine, les réovirus et le *Newcastle disease virus* sont utilisés dans une moindre mesure en thérapie génique. Cependant, la sélectivité uniquement pour les

cellules tumorales font des deux derniers des outils qui deviendront possiblement des plus intéressants dans un avenir très rapproché (Mullen et Tanabe, 2002).

Bien qu'il serait possible de continuer ainsi à décrire chacun des types de vecteurs viraux utilisés en thérapie génique, en ce qui concerne la présente étude, le choix du vecteur s'est porté sur un vecteur rétroviral. Ce type de vecteur a été l'objet des premiers travaux de transfert de gènes *in vivo*, en utilisant le vecteur rétroviral prototype, le *Moloney Murine Leukemia Virus*, utilisé dans la présente étude. Les avantages de ce type de vecteur résident dans son habileté à s'intégrer dans le génome de l'hôte et ainsi de soutenir une expression génique pour une période excessivement longue, mais aussi dans sa capacité d'insert dont la taille est acceptable, soit environ 8 kpb. Toutefois, les vecteurs rétroviraux sont incapables d'infecter les cellules quiescentes, ce qui restreint leur utilisation sur les cellules en division (Wu et Atsai, 2000 ; Lundstrum, 2003). Dans le cas présent, l'intérêt pour le vecteur rétroviral de type MMLV vient de sa capacité à infecter les cellules en division comme les cellules transformées. Généralement, ce type de vecteur, accompagné de cellules *helper* ou lignée cellulaire d'encapsidation, représente le système de transfert de gènes le plus fréquemment utilisé (Hu et Pathak, 2000). Les cellules *helper* sont des cellules qui fournissent en *trans* les protéines virales nécessaires à la réplication du vecteur rétroviral. Le virion obtenu est non répliquatif, mais infectieux, et contient le transgène ayant été inséré dans son génome. Ainsi, les recherches envisagées ici prévoient l'utilisation d'un vecteur rétroviral de type MMLV et l'insertion du gène M des variants TP6 et T1026 de VSV dans son génome. Le vecteur sera utilisé dans le but ultime d'infecter différents types cellulaires (cellules saines et transformées) *in vitro* et d'y exprimer le transgène. Ainsi, la protéine M devrait être produite et l'apoptose des cellules devrait s'en suivre pour ce qui est du variant TP6, alors que le variant T1026 devrait présenter des effets cytopathiques moins marqués. L'utilisation de la lignée cellulaire *helper* représente néanmoins un obstacle à la production des virions infectieux, car durant la réplication du vecteur dans ces cellules, il est envisageable que le gène M soit exprimé et que celui-ci provoque l'apoptose au sein de la lignée d'encapsidation, réduisant dès lors le titre viral obtenu. Ainsi, une solution à ce problème est l'utilisation d'un système d'expression inductible hautement régulé et montrant un taux d'expression basal de l'insert, en l'occurrence le gène M, quasiment nul.

1.5 Les systèmes d'expression inductibles

Plusieurs systèmes d'expression génique inductibles incluant le système Tétracycline (*Off* et *On*), Ecdysone et le système basé sur un *dimerizer* ont été développés avec le temps (Xu *et al.*, 2003). D'autres systèmes existent aussi, mais sont utilisés dans une moindre mesure (Clackson, 2000). Ces systèmes comportent, premièrement, des domaines fonctionnels d'origine procaryote, eucaryote et dérivés de protéines virales formant des transactivateurs chimériques aptes à moduler l'expression génique de manière inducteur-dépendante. De tels transactivateurs contiennent des éléments fonctionnels qui interagissent avec de petites molécules inductrices, soient un domaine de liaison à l'ADN n'interagissant pas avec les séquences cellulaires endogènes et un domaine de transactivation. Le second composant du système est un promoteur inductible, qui généralement est un promoteur minimal situé en aval des séquences répétées reconnues par le transactivateur. Ainsi, en présence de l'inducteur, le facteur de transcription chimérique se fixe à sa séquence de reconnaissance d'ADN spécifique dans le promoteur et transactive l'expression du gène d'intérêt. Plusieurs études ont été réalisées sur la performance de ces systèmes inductibles (Clackson, 2000 ; Senner *et al.*, 2001) tant *in vitro* que chez des modèles murins. Certaines études utilisant les systèmes d'expression inductible ont montré des résultats très prometteurs en terme de réponse aux exigences d'un système efficace et approprié ; c'est-à-dire une expression basale très faible ou nulle en absence de l'inducteur, une expression induite élevée, un ratio d'induction élevé (expression maximale induite/expression basale en absence d'inducteur), l'absence d'interaction avec les processus cellulaires endogènes, une très faible immunogénicité des composants du système et une sécurité confirmée en ce qui a trait à la possibilité de consommer oralement l'inducteur (Xu *et al.*, 2003).

Le système d'expression inductible à la tétracycline est composé de trois éléments principaux : un modulateur transcriptionnel, le promoteur inductible à la tétracycline et un antibiotique de la famille de la tétracycline. Le modulateur transcriptionnel consiste en un répresseur procaryotique de la tétracycline (tetR), qui procure une activité de liaison à l'ADN tétracycline-dépendante, fusionné à un domaine d'activation (TA) ou de répression (TR ou TS) qui est actif chez les cellules eucaryotes. Le promoteur inductible est constitué de sept

copies de la séquence de liaison à l'ADN de tetR (tetO). Ces copies sont alignées en amont d'un élément minimal contenant une boîte TATA et un site d'initiation transcriptionnelle. Ce dernier élément provient généralement du promoteur du cytomégalo virus. Le dernier élément du système est l'antibiotique de la famille de la tétracycline (Corbel et Rossi, 2002). La tétracycline est une petite molécule lipophile qui entre facilement dans les cellules eucaryotes par diffusion passive. Cette molécule a beaucoup été utilisée déjà en médecine vétérinaire et humaine, et elle ne provoque pas, sinon très peu, d'effets secondaires. Parmi la famille des tétracyclines, la doxycycline est la plus utilisée aujourd'hui, et celle-ci est aussi efficace que la tétracycline dans l'activation de la transcription du gène placé sous le contrôle du promoteur inducible. Le facteur de transcription original modulé par la tétracycline (tTA), a été obtenu en fusionnant le répresseur tetR sauvage avec l'activateur transcriptionnel VP16 du virus Herpes. Cette forme du système d'expression inducible à la tétracycline se nomme le système *Tet-Off* car, en présence de tétracycline, tTa est inhibé plutôt qu' activé (Clackson, 1997 ; Gould *et al.*, 2000 ; Corbel et Rossi, 2002). Le retrait de la tétracycline permet l'expression du gène sous le contrôle du promoteur inducible. Certaines mutations au niveau du répresseur tetR ont résulté en la génération d'un facteur de transcription ayant une réponse inverse à la tétracycline (tTA inverse ou rtTA). Avec ce facteur de transcription, l'expression du gène peut être induite plutôt que réprimée par l'ajout de tétracycline ou doxycycline. Cette forme du système d'expression inducible à la tétracycline se nomme le système *Tet-On* (Clackson, 1997 ; Corbel et Rossi, 2002 ; Zabala *et al.*, 2004).

Le système d'expression inducible à l'ecdysone est basé sur des petites hormones stéroïdes et leurs récepteurs, constituant un système naturel de régulation de la transcription. Leur utilisation à des fins de régulation de la transcription d'autres gènes a cependant été compliquée, en raison de l'interférence potentielle avec des hormones endogènes et par la liaison des récepteurs à des gènes endogènes (Clackson, 1997). La solution à ce problème a été d'utiliser le stéroïde ecdysone de *Drosophila*, ou un analogue synthétique comme la Muristérone A ou la Ponastérone A, et son récepteur nucléaire (EcR). Il est aujourd'hui connu que le récepteur fonctionnel de l'ecdysone est une protéine hétérodimérique constituée de EcR et de USP (*Drosophila Ultraspiracle protein*), un autre membre de la famille des récepteurs nucléaires. La liaison de l'ecdysone au récepteur EcR permet aux protéines EcR et

USP d'interagir et de se lier à l'ADN pour activer la transcription. Le système d'expression basé sur l'ecdysone a toutefois été amélioré avec le temps. Ainsi, le facteur régulant la transcription est maintenant composé de deux protéines différentes, un mutant tronqué de EcR fusionné au domaine d'activation de la transcription VP16 du virus Herpes simplex, et l'homologue de USP chez les mammifères, le récepteur du rétinoloïde X (RXR) (Clackson, 2000 ; Wyborski *et al.*, 2001 ; Xiao *et al.*, 2003). Étant donné que le site de liaison à l'ADN de EcR est aussi reconnu par un récepteur humain, le récepteur du farnésoloïde X humain, la séquence a été altérée de manière à n'être reconnue que par le récepteur mutant EcR. Ces modifications ont permis de réduire au maximum la transcription basale du système, et l'induction de l'expression a été augmentée de 10 000 fois (Clackson, 1997).

Il a été démontré que le système *dimerizer* (Figure 2), inductible avec un analogue de la rapamycine, est supérieur aux autres systèmes au niveau de chacun des paramètres énumérés précédemment. Dans ce système, la caractéristique unique le distinguant des autres réside dans le domaine de liaison à l'ADN et le domaine d'activation de la transcription, qui sont fonctionnellement séparés et exprimés comme des protéines individuelles. Le transactivateur transcriptionnel est reconstitué en présence de l'inducteur seulement. De plus, aucune protéine virale ne fait partie du système, ce qui réduit les risques d'immunogénicité (Pollock *et al.*, 2002 ; Pollock et Clackson, 2002). La stratégie du système est basée sur l'utilisation d'inducteurs chimiques de dimérisation, des *dimerizers*, pour induire l'interaction de deux protéines modifiées (Spencer *et al.*, 1993). Les constituants du vecteur sont basés sur la protéine humaine FKBP12 et ses ligands, FK506, la Rapamycine et certains de ses analogues comme AP21967, utilisés comme inducteurs. Ces drogues agissent naturellement comme des hétérodimères et elles ont été utilisées antérieurement pour contrôler la transcription (Rivera *et al.*, 1996 ; Ho *et al.*, 1996). L'inducteur fonctionne en se liant avec une grande affinité à FKBP, et ensuite à FRAP, formant ainsi un hétérodimère en joignant les deux protéines ensembles (Choi *et al.*, 1996). Ce système, comme les autres ayant été mentionnés précédemment, a été reconfiguré de manière à obtenir une expression optimale et est conçu entièrement à partir de protéines d'origine humaine. D'abord, le domaine de liaison à l'ADN est ZFHD1. C'est un domaine de liaison chimérique comprenant deux modules de liaison à l'ADN (un doigt de zinc et un homéodomaine). Séparément, ces deux modules

n'ont pas d'affinité de liaison significative, mais ensemble, ils lient une nouvelle séquence cible avec une grande affinité. Le domaine de liaison à l'ADN a été joint à deux copies de la protéine FKBP, ayant la capacité de se lier à la rapamycine ou ses dérivés. Le domaine d'activation, quant à lui, est constitué d'une portion de 190 acides aminés de la sous-unité p65 de la protéine NF- κ B humaine, qui permet une activation particulièrement forte de la transcription des gènes placés sous le contrôle du promoteur du système. La sous-unité p65 de NF- κ B a été fusionnée à une partie de HSF-1 et à une copie du domaine FRB de la protéine FRAP, ce qui permet la liaison avec la rapamycine ou ses dérivés. Les deux protéines de fusion servant de facteurs de transcription sont exprimées à partir d'un seul transcrit bicistronique par l'utilisation d'un IRES. Chacune des protéines contient la séquence du signal de localisation nucléaire de c-Myc humain en N-terminal. La cassette d'expression du gène cible comprend 12 sites de reconnaissance consécutifs pour ZFHD1, suivis du promoteur minimal de l'IL-2, constitué d'une seule boîte TATA et choisi en raison de son inactivité en absence des domaines d'activation (Pollock et Clackson, 2002). L'utilisation des *dimerizers* pour contrôler l'expression génique est bien établie aujourd'hui et les configurations optimales pouvant être apportées au système ont été réalisées.

Le système d'expression choisi pour la présente étude a été obtenu de la compagnie ARIAD Pharmaceuticals Inc. Il s'agit du ARGENT™ Regulated Transcription Retrovirus Kit, All-in-one vector pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL (Figure 2). Cette trousse contient tout ce qui est nécessaire pour placer la transcription d'un gène d'intérêt, en l'occurrence le gène M des deux variants du VSV, TP6 et T1026, sous le contrôle de la molécule appelée *dimerizer*, et il devrait permettre d'obtenir une expression du gène d'intérêt hautement régulée dans le cadre d'investigations *in vitro*. Dans le cas présent, le système choisi est déjà incorporé dans un vecteur rétroviral, ce qui correspond aux besoins de l'étude. Dans la présente recherche, ce système d'expression inductible représente un outil de choix afin de réguler l'expression du gène M des deux variants de VSV. De plus, dans le contexte de vecteur rétroviral utilisé ici, il a été démontré que le système d'expression inductible à un analogue de la rapamycine décrit ci-haut pouvait être utilisé dans un vecteur rétroviral et qu'il était possible d'exprimer une protéine toxique à l'aide de celui-ci (Pollock *et al.*, 2000). Il a également été démontré que ce système pouvait être utilisé de manière sécuritaire *in vivo* dans des modèles animaux.

(Auricchio *et al.*, 2002 ; Crittenden *et al.*, 2003). Ainsi, dans le souci d'utiliser un vecteur hautement régulé, le vecteur rétroviral contenant le système d'expression inductible à un analogue de la rapamycine a été utilisé. Le gène M des deux variants de VSV a été introduit sous le contrôle du système d'expression, ce qui permet d'utiliser une lignée d'encapsidation afin de produire les virions infectieux en absence de production de M. Finalement, l'infection de différents types cellulaires devait être effectuée avec le virus/vecteur, afin de déterminer sa capacité à provoquer l'apoptose, après induction, chez les cellules en culture.

1.6 Oncolyse virale

La virothérapie, ou l'oncolyse virale, représente une nouvelle et prometteuse stratégie pour le traitement du cancer (Nettelbeck, 2003). L'habileté de modifier génétiquement des virus et d'en faire des vecteurs ayant la capacité d'attaquer les tumeurs n'est qu'un phénomène relativement récent. Plus on en apprend sur les fonctions de certains produits de gènes viraux, comme la protéine M de VSV, dans le contrôle du cycle cellulaire des mammifères ou la modulation du système immunitaire, plus les possibilités d'utiliser ces outils à d'autres fins voient le jour (Mullen et Tanabe, 2002). Les avancées récentes dans les domaines de biologie moléculaire, génétique et virologie permettent de développer des outils de thérapie du cancer ayant une plus grande efficacité et une plus grande spécificité pour les tumeurs. En armant ces vecteurs avec des gènes thérapeutiques ou des gènes suicides et en combinant ces outils novateurs aux méthodes de traitement conventionnelles, cela laisse entrevoir de belles percées scientifiques dans un avenir qui n'est pas si lointain.

1.7 Hypothèses générales de travail

L'importance et les implications du projet proposé ici s'inscrivent dans la foulée des protocoles de thérapie génique énumérés précédemment. En fait, la recherche proposée projette de développer un vecteur de type rétroviral, contenant dans son génome un gène pro-apoptotique ayant la capacité d'induire la mort cellulaire, et ce tout en étant sous le contrôle d'un promoteur inductible afin d'éviter l'expression du transgène en dehors du contexte désiré. Le gène ayant la capacité de provoquer la mort cellulaire est le gène M codant pour la

protéine du même nom du Virus de la Stomatite Vésiculaire, utilisé dans le laboratoire du Dr. Laurent Poliquin. Le système d'expression inductible a été obtenu de la compagnie ARIAD Inc. Une fois le vecteur construit, il est prévu d'utiliser celui-ci dans le but de transfecter et d'infecter, *in vitro*, des cultures de cellules saines et de cellules transformées, puis d'induire la synthèse de la protéine M afin de provoquer la mort cellulaire. Il est reconnu que les vecteurs viraux sont de plus en plus utilisés dans le domaine de la thérapie génique. Ainsi, l'utilisation de ce type de vecteur semble prédestinée dans la poursuite du but de la recherche exposée ici, soit introduire un gène pro-apoptotique dans différents types cellulaires et permettre l'expression de celui-ci via un promoteur inductible par un agent inducteur. Les hypothèses générales de travail ayant été émises à partir du projet sont :

- 1) Les vecteurs générés, par leur mode d'action et leur construction, auront la capacité de provoquer l'apoptose chez un nombre varié de types cellulaires, dont les cellules transformées.
- 2) Le type de système de régulation du gène pro-apoptotique M utilisé permettra d'obtenir les résultats escomptés, soit une expression de la protéine M seulement après avoir induit le promoteur inductible, sans expression basale en absence de l'inducteur, facilitant ainsi l'obtention de titres viraux élevés dans la lignée d'encapsulation (cellules *helper*).
- 3) L'utilisation de virus comme vecteur de transport de la construction permettra d'atteindre une large proportion des cellules en culture *in vitro* par opposition à la transfection de la construction.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Construction des vecteurs pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-EGFP, pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 et pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MT1026

Les gènes EGFP (*enhanced green fluorescent protein*), MTP6 et MT1026 ont respectivement été insérés dans le site de clonage multiple (MCS) du vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL, qui contient les sites de restriction ClaI, BglII et EcoRI. De plus, les inserts ont été orientés en direction 3'→ 5', de manière à être placés dans le sens inverse de la transcription du génome rétroviral. Différentes stratégies de clonage ont été utilisées afin de construire les trois vecteurs.

2.1.1 Vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-EGFP

Le gène EGFP provient du vecteur pCMV5 (Invitrogen), dans lequel il était cloné en EcoRI/HindIII dans l'orientation 5'→ 3'. Le gène a été retiré du MCS en utilisant les enzymes de restriction EcoRI et XbaI, et il a été sous-cloné dans le vecteur pTis (Chambard et Pognonec, 1998) en EcoRI/XbaI dans l'orientation 5'→ 3'. Le vecteur pTis possède un site de restriction ClaI, nécessaire dans l'étape de clonage finale. Le gène EGFP a ensuite été retiré du MCS de pTis en utilisant les enzymes EcoRI et ClaI, pour être finalement introduit dans le vecteur d'expression eucaryote pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL en ClaI/EcoRI dans l'orientation 3'→ 5'.

2.1.2 Vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6

Le gène MTP6 provient du vecteur pRc/CMV (Invitrogen), dans lequel il était cloné en SmaI dans l'orientation 5'→ 3'. Le gène a été retiré du MCS en utilisant les enzymes de restriction EcoRI et XbaI, et il a été sous-cloné dans le vecteur pTis en EcoRI/XbaI dans

l'orientation 5'→ 3'. Le gène MTP6 a ensuite été retiré du MCS de pTis en utilisant les enzymes EcoRI et ClaI, et il a été introduit dans le vecteur d'expression eucaryote pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL en ClaI/EcoRI dans l'orientation 3'→ 5'.

2.1.3 Vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MT1026

Le gène MT1026 a été amplifié par la méthode de PCR, en utilisant comme plateforme de départ le vecteur pTis dans lequel le gène MT1026 était cloné, et en utilisant des amorces (Tableau I) munies des sites de reconnaissance des enzymes de restriction nécessaires à l'insertion du gène dans le vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL. Après amplification du gène MT1026 par PCR, l'amplicon a été digéré avec les endonucléases de restriction EcoRI et ClaI, puis il a été introduit dans le vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL en ClaI/EcoRI dans l'orientation 3'→ 5'.

Tableau I- Séquences des amorces utilisées pour l'amplification par PCR du gène MT1026

Nom de l'amorce	Séquence ^{a, b}
VSV (M) HR 5' EcoRI	cgtagaattccatgagttccttaagaagatt
VSV (M) HR 3' ClaI	cgttatcgattcatttgaagtggctgacagaa

^a en gras : séquences de reconnaissance par EcoRI et ClaI respectivement.
soulignées : séquences complémentaires aux extrémités 5' et 3' respectivement du gène M de VSV.

^b Tirées des séquences publiées par: Rose et Gallione (1981), confirmées pour les variants TP6 et T1026 par Beausoleil (1994).

L'insertion respective des gènes EGFP, MTP6 et MT1026 dans le vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL a été vérifiée par digestion enzymatique des constructions avec DraI, une endonucléase coupant à deux endroits dans le vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL et permettant de vérifier la présence d'un insert dans le MCS. Le résultat de la digestion a été séparé sur gel d'agarose 1%.

2.2 Production d'acides nucléiques pour les transfections

La transfection des vecteurs pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-EGFP, pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 et pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MT1026 dans des cellules eucaryotes nécessite une quantité élevée

de vecteur. Afin d'obtenir des quantités appréciables de chacun des vecteurs, ces derniers ont été introduits dans des bactéries, produits à grande échelle et purifiés. Les préparations d'ADN plasmidique ont été réalisées à partir des cultures bactériennes, qui ont été traitées et purifiées sur colonne, et selon les indications du fabricant (Qiagen).

2.3 Séquençage de l'insert des vecteurs pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-EGFP, pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 et pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MT1026

Afin de s'assurer de l'intégrité de la séquence nucléotidique des gènes qui ont été insérés dans le vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL, en l'occurrence EGFP, MTP6 et MT1026, les vecteurs ont été envoyés au Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill afin d'y être séquencés. Les amorces (Tableau II) qui ont été utilisées pour le séquençage ont permis de déterminer la séquence nucléotidique comprise dans le MCS du vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL et d'en vérifier l'intégrité.

Tableau II- Séquences des amorces utilisées pour le séquençage du MCS de pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL.

Nom de l'amorce	Séquence ^a
pL ₆ 5'	ttatcatgtctgctcgaagcggcc
pL ₆ 3'	acctcaactcctgccacaagcttg

^a Tirées des séquences publiées par : ARIAD Pharmaceuticals, Inc., 2002.

2.4 Culture des lignées cellulaires

Les diverses expérimentations ont nécessité l'utilisation de lignées cellulaires n'ayant pas les mêmes besoins en nutriments afin de croître, expliquant ainsi les différences entre les milieux de culture qui ont été utilisés selon la lignée cellulaire.

2.4.1 Lignées cellulaires NIH 3T3, NIH 3T3 *Ras* et Phœnix écotrope

Les lignées en culture ont été incubées à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO₂, dans du D-MEM (Invitrogen) avec 10% (v/v) de sérum de veau fœtal. Ce milieu était

supplémenté avec 100 U/ml pénicilline et 100 µg/ml streptomycine. Pour les cellules Phoenix écotrope, le milieu était en plus supplémenté durant une semaine avec 200 µg/ml Hygromycine B et 2 µg/ml Toxine diphthérique. La différence qui réside entre les lignées cellulaires NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras*, vient du fait que la lignée *Ras* est une lignée transformée portant une mutation au niveau de l'oncogène *Ras*. Cette mutation (G₁₂V) provoque une substitution d'une glycine pour une valine au niveau du 12^{ème} acide aminé de la protéine Harvey-Ras.

2.4.2 Lignées cellulaires HeLa et L-929

Les lignées en culture ont été incubées à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO₂, dans du milieu α-MEM (Invitrogen) avec 10% (v/v) de sérum de veau de nouveau-nés. Ce milieu était supplémenté avec 100 U/ml pénicilline et 100 µg/ml streptomycine.

2.5 Transfections transitoires des vecteurs, induction et détection

Afin de vérifier la fonctionnalité et l'inductibilité du système d'expression utilisé, des transfections transitoires du vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-EGFP ont été effectuées sur différentes lignées cellulaires. Une fois les paramètres de transfection établis avec le vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-EGFP, des essais d'expression de la protéine M ont été effectués avec le vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6.

2.5.1 Transfection transitoire du vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-EGFP et microscopie confocale

Les cellules étaientensemencées la veille de la transfection dans des plaques de 4 puits (Nunc) à raison de 1 x 10⁵ cellules par puits pour la lignée NIH 3T3, et 1,4 x 10⁵ cellules par puits pour les lignées HeLa et L-929. La transfection a été réalisée selon les directives du fabricant (Qiagen) avec un ratio de 3,2 µg d'ADN : 8 µl de Lipofectamine 2000 pour les cellules NIH 3T3, et de 3 µg d'ADN : 3 µl de Lipofectamine 2000 pour les lignées cellulaires HeLa et L-929. Après 6 heures d'exposition des cellules à l'ADN transfecté, l'inducteur du système d'expression, soit le AP21967 qui est un analogue de la rapamycine,

était ajouté au milieu de culture à une concentration finale de 100 nM. Les cellules étaient ensuite observées en microscopie confocale afin de détecter celles exprimant la protéine EGFP et mesurer l'efficacité de transfection.

2.5.2 Transfection transitoire du vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 et immunofluorescence indirecte

Les cellules HeLa et L-929 étaientensemencées la veille de la transfection dans des lames de culture à 4 puits LABTEK (Nunc) à raison de 1×10^5 cellules par puits. La transfection a été réalisée selon les directives du fabricant (Qiagen) avec un ratio de 5 µg d'ADN : 3 µl de Lipofectamine 2000 pour chacune des lignées cellulaires. Après 6 heures d'exposition à l'ADN transfecté, l'inducteur était ajouté au milieu de culture à une concentration finale de 100 nM. Les cellules étaient fixées au paraformaldéhyde 4% (p/v) 24 heures post-induction. Par la suite, les cellules étaient marquées avec 100 µl par puits d'anticorps de lapin polyclonal anti-VSV dilué 1/500 dans du PBS : 1% NCS (v/v), puis avec un anticorps anti-lapin couplé à la PE dilué également dans du PBS : 1% NCS (v/v) selon les normes du fabricant (Cedarlane). Les cellules étaient ensuite observées en microscopie confocale afin de détecter celles marquées par la PE.

2.5.3 Co-transfection de pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-EGFP et pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6

Les vecteurs pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-EGFP et pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 ont été co-transfectés sur les cellules HeLa et L-929 afin de s'assurer que les deux vecteurs présentaient une efficacité de transfection similaire. Les conditions énumérées en 2.5.1 et 2.5.2 ont été utilisées pour la transfection de chacun des vecteurs respectivement. Les cellules étaient ensuite observées en microscopie confocale afin de détecter celles exprimant EGFP et celles marquées par la PE simultanément.

2.5.4 Transfection transitoire du vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 et évaluation du contenu en ADN

Les cellules HeLa et L-929 étaient ensemencées la veille de la transfection dans des plaques de 4 puits (Nunc) à raison de $1,4 \times 10^5$ cellules par puits. La transfection a été réalisée selon les directives du fabricant (Qiagen) avec un ratio de 3, 4 et 5 µg d'ADN : 3 µl de Lipofectamine 2000 pour chacune des lignées cellulaires. Après 6 heures d'exposition à l'ADN transfecté, l'inducteur était ajouté au milieu de culture à une concentration finale de 100 nM. Les cellules étaient trypsinées et récoltées 48 heures post-induction, lavées au PBS et fixées au paraformaldéhyde 4% (p/v). Après deux lavages au PBS, les cellules fixées étaient resuspendues dans une solution de marquage composée de PBS additionné de 20 µg/ml d'iodure de propidium (Sigma) et de 1 mg/ml d'ARNase. Les cellules étaient ensuite incubées durant 30 minutes à 37°C à l'abri de la lumière, puis analysées par cytométrie en flux avec un appareil Becton Dickinson. Les données obtenues ont été traitées par le logiciel WinMDI.

2.6 Lignées cellulaires stables

2.6.1 Établissement des lignées cellulaires stables

L'ADN des vecteurs pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-EGFP, pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 et pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MT1026 a été linéarisé à l'aide de l'enzyme de restriction ScaI et précipité dans un environnement stérile avant de procéder à l'électroporation. L'électroporation a été effectuée sur les lignées cellulaires HeLa, L-929, NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras* avec chacun des vecteurs respectivement, et selon les directives établies par le fabricant (Bio-Rad). Une journée post-électroporation, le milieu de culture des cellules a été changé pour un milieu de sélection additionné de G418 (Invitrogen) active à une concentration finale de 600 µg/ml. Le milieu de sélection a été changé à tous les trois jours jusqu'à l'obtention de clones bien établis. Les clones ont été repiqués en plaques de 24 puits (Sarstedt) dans un environnement stérile, puis en plaques de 6 puits (Sarstedt). Deux échantillons de cellules de chacun des clones d'environ 10^6 cellules ont été congelés à -80°C.

2.6.2 Évaluation de la viabilité des lignées stables après induction de l'expression de la protéine M

Les clones HeLa étaient ensemencés la veille à raison de 5×10^4 cellules par puits dans des plaques de 24 puits. Le lendemain matin, le milieu était changé pour ajouter un milieu additionné de l'inducteur à différentes concentrations, variant de 0 à 25 nM respectivement. Une échelle de concentrations différentes, variant de 0 à 500 nM, a été utilisée pour un clone qui semblait particulier. Un dénombrement des cellules bleues et blanches par exclusion au bleu de Trypan était réalisé directement dans le puits à 48 heures post-induction pour chacune des concentrations d'inducteur utilisées. Pour ce faire, une photographie numérique de trois champs visuels de chacun des puits était effectuée en microscopie optique à un grossissement de 100x.

Les clones NIH 3T3 étaient ensemencés la veille à raison de 5×10^4 cellules par puits dans des plaques de 24 puits. Le lendemain matin, le milieu était changé pour ajouter un milieu additionné de l'inducteur à différentes concentrations, variant de 0 à 500 nM respectivement. Un dénombrement des cellules bleues et blanches par exclusion au bleu de Trypan était réalisé à 4 heures et 12 heures post-induction pour chacune des concentrations d'inducteur utilisées. Pour ce faire, une photographie numérique de chacun des puits était effectuée en microscopie optique à un grossissement de 100x.

Les clones NIH 3T3 *Ras* étaient ensemencés la veille à raison de 5×10^4 cellules par puits dans des plaques de 24 puits. Le lendemain matin, le milieu était changé pour ajouter un milieu additionné de l'inducteur à différentes concentrations, variant de 0 à 500 nM respectivement. Le surnageant et les cellules étaient récupérées à 4 heures et 12 heures post-induction, centrifugées et lavées avec du PBS. Par la suite, les cellules étaient resuspendues dans du PBS additionné de 20 µg/ml d'iodure de propidium. Les cellules étaient ensuite incubées durant 30 minutes à 37°C dans l'obscurité et analysées par cytométrie en flux avec un appareil Becton Dickinson.

2.7 Analyse de l'expression inducible

2.7.1 Détection de la protéine M par Immunobuvardage

Les clones NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras* étaient ensemencés la veille à raison de $1,5 \times 10^6$ cellules dans un plat de pétri de 6 cm (Sarstedt). Le lendemain matin, le milieu était changé pour ajouter un milieu additionné de l'inducteur à une concentration finale de 100 nM. Le surnageant et les cellules étaient récupérées 24 heures post-induction. Une fois lavées avec du PBS, les cellules étaient resuspendues dans du tampon de lyse et les protéines étaient extraites, puis dosées. Une quantité fixe de 20 µg de protéines de chacun des clones a été déposée sur gel de polyacrylamide 12%, puis séparée par migration à 150 Volts. Les protéines du gel ont ensuite été transférées sur une membrane de PVDF (Millipore), et cette dernière a été déposée dans une solution de blocage composée de lait en poudre 5%, puis lavées avec une solution de PBS/Tween 0,05%. Les membranes ont par la suite été exposées à un anticorps de souris monoclonal dilué 1/20 000 dans la solution de blocage et dirigé contre la protéine M du VSV ou un anticorps de lapin polyclonal dilué 1/10 000 dirigé contre toutes les protéines du VSV. Finalement, la réaction a été révélée par un second anticorps anti-IgG conjugué à la peroxydase, dilué 1/5000 et dirigé contre le premier (Amersham). Les membranes ont finalement été exposées sur film.

2.7.2 Détection de l'ARN_m du gène M par RT-PCR

Les clones NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras* étaient ensemencés la veille à raison de $1,5 \times 10^6$ cellules dans un plat de pétri de 6 cm. Le lendemain matin, le milieu était changé pour ajouter un milieu additionné de l'inducteur à une concentration finale de 100 nM. Le surnageant et les cellules étaient récupérées 24 heures post-induction. Une fois lavées avec du PBS, les cellules ont été resuspendues dans un tampon de lyse et l'extraction des ARN totaux du lysat cellulaire a été effectuée selon les normes du fabricant (Omega Bio-Tek). Une fois les ARN obtenus, leur quantité a été évaluée par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 260 nm. Par la suite, 1 µg d'ARN de chacun des clones a été utilisé afin de réaliser la transcription inverse de l'ARN_m du gène M de VSV. Pour ce faire, une amorce (Tableau III)

spécifique au gène M a été utilisée, de manière à limiter la reverse transcription à cet ARN messenger. La transcription inverse a été réalisée à 37°C durant une heure avec la reverse transcriptase MMLV selon les directives du fabricant (Invitrogen). L'amplification par PCR de l'ADN complémentaire de l'ARN_m du gène M de VSV a aussi été réalisée à l'aide d'amorces (Tableau III) spécifiques, permettant de n'amplifier que le gène M. La réaction de PCR a été effectuée avec une *Taq* polymérase recombinante (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. Les produits de PCR ont ensuite été séparés par migration sur gel d'agarose 1%.

Tableau III- Séquences des amorces utilisées pour la réaction de RT-PCR

Nom de l'amorce	Séquence ^a
RT	catagggatagaaaagacagg
PCR 5'	agaagattctcgggtctgaagg
PCR 3'	ttagttgttcgaaaggctgg

^a Tirées des séquences publiées par: Rose et Gallione (1981), confirmées pour les variants TP6 et T1026 par Beausoleil (1994).

2.8 Production des virus/vecteurs pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-EGFP, pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 et pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MT1026

L'électroporation des vecteurs pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-EGFP, pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 et pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MT1026 a été réalisée sur 10⁶ cellules de la lignée d'encapsidation Phœnix écotrope, selon les directives établies par le fabricant (Bio-Rad). Les cellules ont par la suite été remises en culture dans des pétris de 6 cm. Le surnageant viral a été récupéré à 48 heures post-électroporation, purifié sur filtre de 0,45 µm (Millipore) et congelé à -80°C. Une fraction du surnageant viral, soit 1 ml, a été immédiatement utilisée afin de procéder à une infection de cellules NIH 3T3 dans le but de titrer les particules virales infectieuses.

2.9 Titration des particules rétrovirales infectieuses des virus/vecteurs pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-EGFP, pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 et pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MT1026

Les cellules NIH 3T3 étaient ensemencées la veille à raison de 5×10^5 cellules par pétri de 6 cm. Le lendemain, le milieu de culture était retiré et 1 ml de surnageant viral, additionné de 8 µg/ml de polybrène, de chacun des virus/vecteurs était respectivement ajouté aux pétris de cellules NIH 3T3. Une journée post-infection, le milieu de culture des cellules infectées était changé pour un milieu de sélection additionné de G418 (Invitrogen) active à une concentration finale de 600 µg/ml. Le milieu de sélection a été changé à intervalles de trois jours, dans le but d'obtenir des clones résistants correspondant à des foyers d'infection.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

Une des hypothèses de départ était que la protéine M du VSV a la capacité de provoquer l'apoptose des cellules au sein desquelles elle est exprimée. Ainsi, introduire le gène pro-apoptotique M du VSV dans différents types cellulaires et permettre l'expression de celui-ci via un promoteur inducible devrait permettre d'atteindre ce but. Trois méthodes différentes ont été utilisées afin de réaliser cet objectif : d'abord la transfection transitoire du gène M permettant l'expression inducible de la protéine chez une partie de la population cellulaire transfectée, ensuite la création de lignées cellulaires stables exprimant également de manière inducible la protéine M et finalement l'utilisation d'un vecteur rétroviral permettant l'infection d'une grande proportion de cellules et l'expression inducible de la protéine M. Par conséquent, le gène M du VSV a été introduit dans le vecteur d'expression pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL, qui contient un système d'expression inducible composé de deux facteurs de transcription formant un hétérodimère en présence de l'inducteur, ce qui permet l'activation de la transcription du gène M à partir du promoteur inducible de l'IL-2. Différentes lignées cellulaires ont été utilisées, dont HeLa (cellule épithéliale humaine) et L-929 (cellule fibroblastique murine) chez qui l'induction de l'apoptose par la protéine M de VSV a été démontrée, et NIH 3T3 (cellule fibroblastique murine) une lignée semblable à L-929 dont une version transformée (NIH 3T3 *Ras*) était également disponible.

3.1 Évaluation de la fonctionnalité du système d'expression inducible

Les premières variables qui ont été étudiées lors du projet étaient la fonctionnalité du système d'expression inducible et la réponse de celui-ci à différentes concentrations de l'inducteur AP21967 (un analogue de la rapamycine) et l'efficacité de transfection du vecteur sur les diverses lignées cellulaires utilisées. Ainsi, le vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-EGFP a été transfecté à l'aide de la Lipofectamine 2000 (Qiagen) dans les lignées cellulaires NIH 3T3, HeLa et L-929, puis induit avec des doses variables d'inducteur. L'expression du gène

EGFP a été évaluée à 48 post-induction par détection de fluorescence verte en microscopie confocale (Figure 3). Il a été déterminé que la dose nécessaire d'inducteur pour permettre la détection de EGFP était de 100 nM. En ce qui a trait à l'efficacité de transfection, les cellules NIH 3T3 ont montré l'efficacité la plus faible par rapport aux lignées HeLa et L-929. Aucune fluorescence n'a été détectée en absence d'inducteur (non présenté). Dans l'ensemble, l'efficacité de transfection du vecteur s'est avérée faible, environ 5 à 10% des cellules exprimant le transgène selon la lignée cellulaire. Bien que les recommandations du fabricant aient été suivies et qu'une optimisation des paramètres expérimentaux ait été réalisée, il n'a pas été possible d'obtenir une efficacité de transfection supérieure. Cette faible efficacité pourrait en partie être expliquée par la taille du vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-EGFP, soit plus de 10 kpb.

3.2 Transfection du vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 et immunofluorescence indirecte

Le vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 a été transfecté sur les lignées cellulaires HeLa et L-929, compte tenu de l'efficacité de transfection obtenue avec pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-EGFP. L'expression de la protéine MTP6 a été induite avec une concentration d'inducteur de 100 nM, et la protéine a pu être détectée par microscopie confocale à 48 heures post-induction, après un marquage à la PE en immunofluorescence indirecte utilisant un anticorps anti-VSV (Figure 4). Les résultats obtenus ont montré, une faible efficacité de transfection des cellules, permettant néanmoins la détection de MTP6 chez les cellules transfectées marquées à la PE. Les cellules marquées, ayant exprimé la protéine M de VSV, montrent une morphologie différente des cellules non transfectées, ce qui est une caractéristique typique des effets cellulaires engendrés par l'expression de la protéine M (Blondel *et al.*, 1990). Aucune fluorescence n'a été détectée en absence d'inducteur (non présenté).

3.3 Co-transfection de pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-EGFP et pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6

Les vecteurs pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-EGFP et pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 ont ensuite été co-transfectés afin de s'assurer que les deux vecteurs avaient une efficacité de transfection équivalente. Les résultats obtenus ont démontré qu'effectivement, l'efficacité de

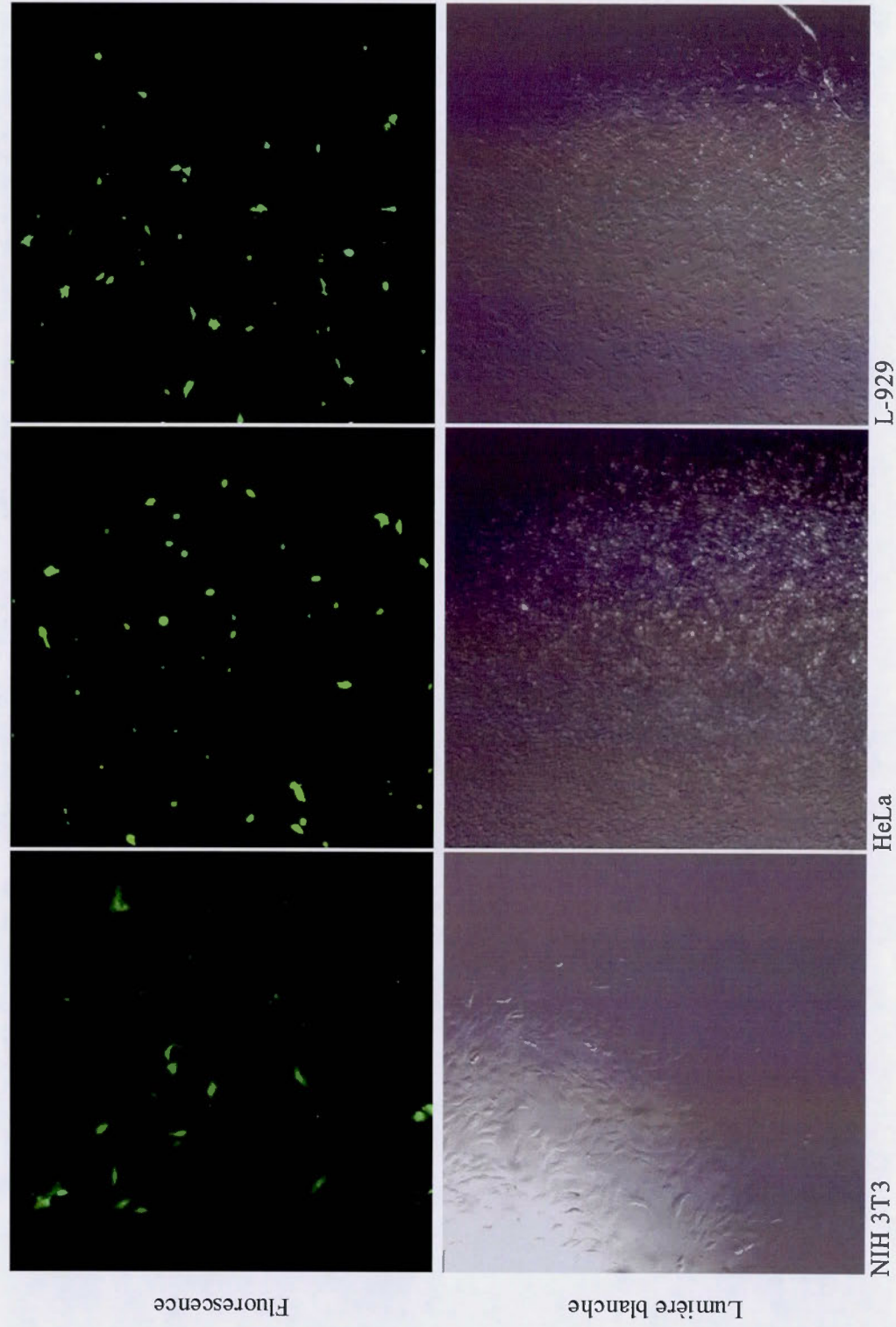


Figure 3. Transfection du vecteur $pL_6N_2-R_HS3H/ZF2-PL-EGFP$ sur les lignées cellulaires NIH 3T3, HeLa et L-929. L'induction de l'expression de EGFP a été effectuée avec 100 nM de AP21967 et la détection de la protéine EGFP a été réalisée par détection de la fluorescence verte en microscopie confocale 48 heures post-induction.

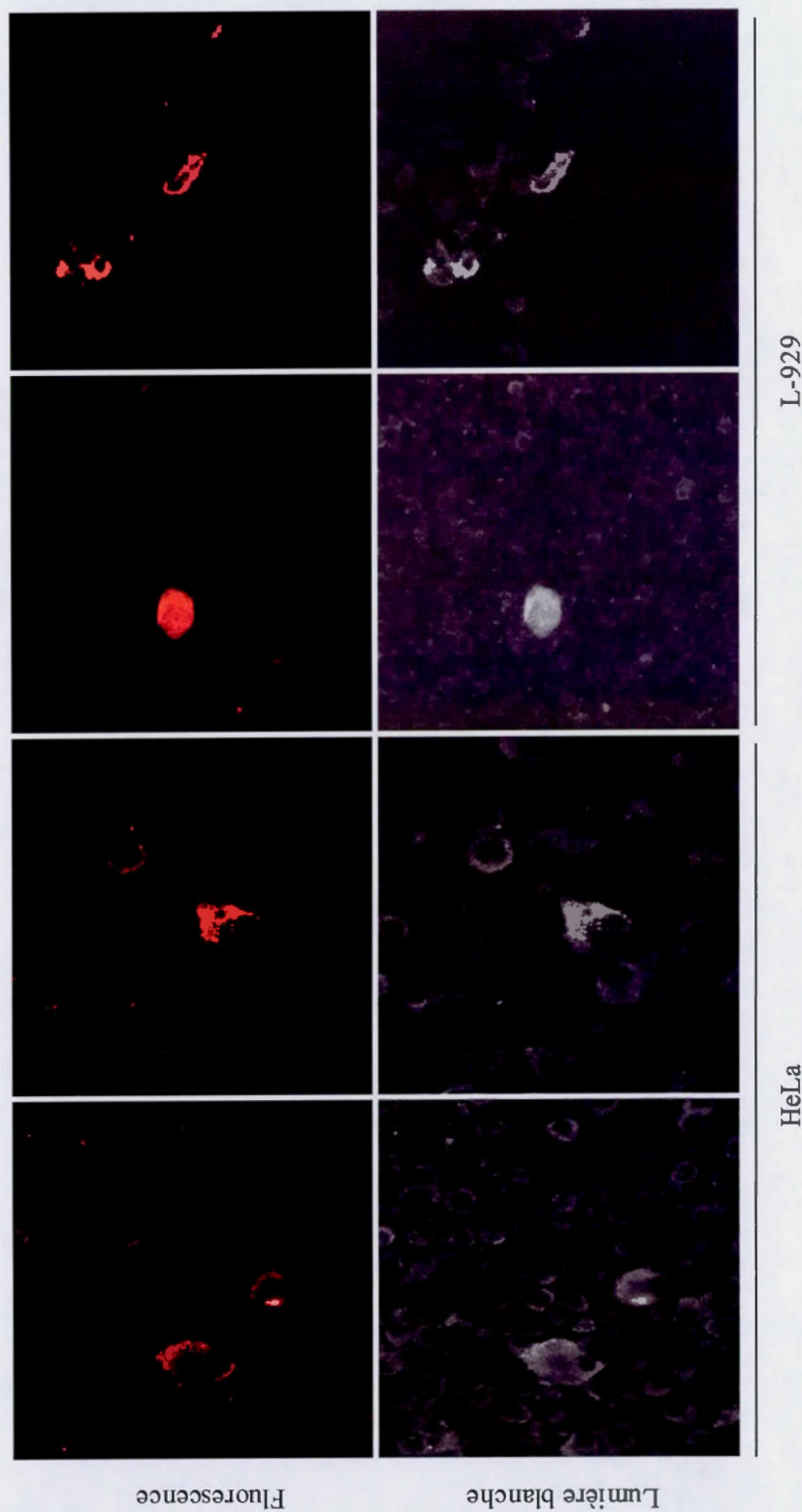


Figure 4. Transfection du vecteur $pL_{6}N_{2}-R_{H}S3H/ZF2-PL-MTP6$ sur les lignées cellulaires HeLa et L-929. L'induction de l'expression de MTP6 a été effectuée avec 100 nM de AP21967. La détection de la protéine M a été réalisée par immunofluorescence indirecte et détection de la fluorescence rouge en microscopie confocale 48 heures post-induction.

transfection est comparable d'un vecteur à l'autre, car ceux-ci ont été détectés simultanément chez la plupart des cellules observées ayant été transfectées (Figure 5). La morphologie des cellules transfectées par le vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 présentait une fois de plus des caractéristiques particulières, attribuables à l'expression de la protéine M du VSV.

3.4 Transfection du vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 et évaluation du contenu en ADN

Bien que l'efficacité de transfection du vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 soit faible, variant de 5 à 10% environ, une évaluation du contenu en ADN des cellules transfectées a été réalisée. L'évaluation du contenu en ADN a été effectuée à 48 heures post-induction par coloration au PI de cellules fixées, une méthode permettant de quantifier la répartition des cellules dans le cycle cellulaire et la proportion des cellules en apoptose. D'abord, la toxicité de l'agent de transfection a été évaluée, de manière à s'assurer que celui-ci ne pouvait altérer la viabilité des cellules transfectées (Figure 6a). Les résultats obtenus ont montré que la quantité de Lipofectamine 2000 utilisée n'altérait pas la viabilité cellulaire, la majorité des cellules ayant un contenu en ADN correspondant aux phases G₀-G₁, S ou G₂ du cycle cellulaire. Les cellules HeLa et L-929 ont été transfectées avec diverses quantités de vecteur, 3 à 5 µg, et l'expression de la protéine MTP6 a été induite avec 100 nM de AP21967. Les résultats obtenus (Figure 6b) ont montré que le profil en ADN des cellules HeLa ne semblait pas affecté par l'expression de la protéine M, peu importe la quantité de vecteur transfectée. Cependant, pour ce qui est de la lignée L-929, le tracé 3 µg de vecteur/Inducteur⁺ (noir), semble indiquer une faible sous-population cellulaire ayant un contenu en ADN sub-G₀-G₁ (flèche), ce qui pourrait représenter des cellules en apoptose. La faible efficacité de transfection du vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 ne permet toutefois pas de démontrer clairement une sous-population cellulaire montrant des signes d'apoptose ayant été provoqués par l'expression de la protéine M.

3.5 Établissement de lignées cellulaires stables

Afin d'obtenir une population cellulaire homogène exprimant la protéine M du VSV de manière inductible, par opposition à la transfection transitoire où une proportion des

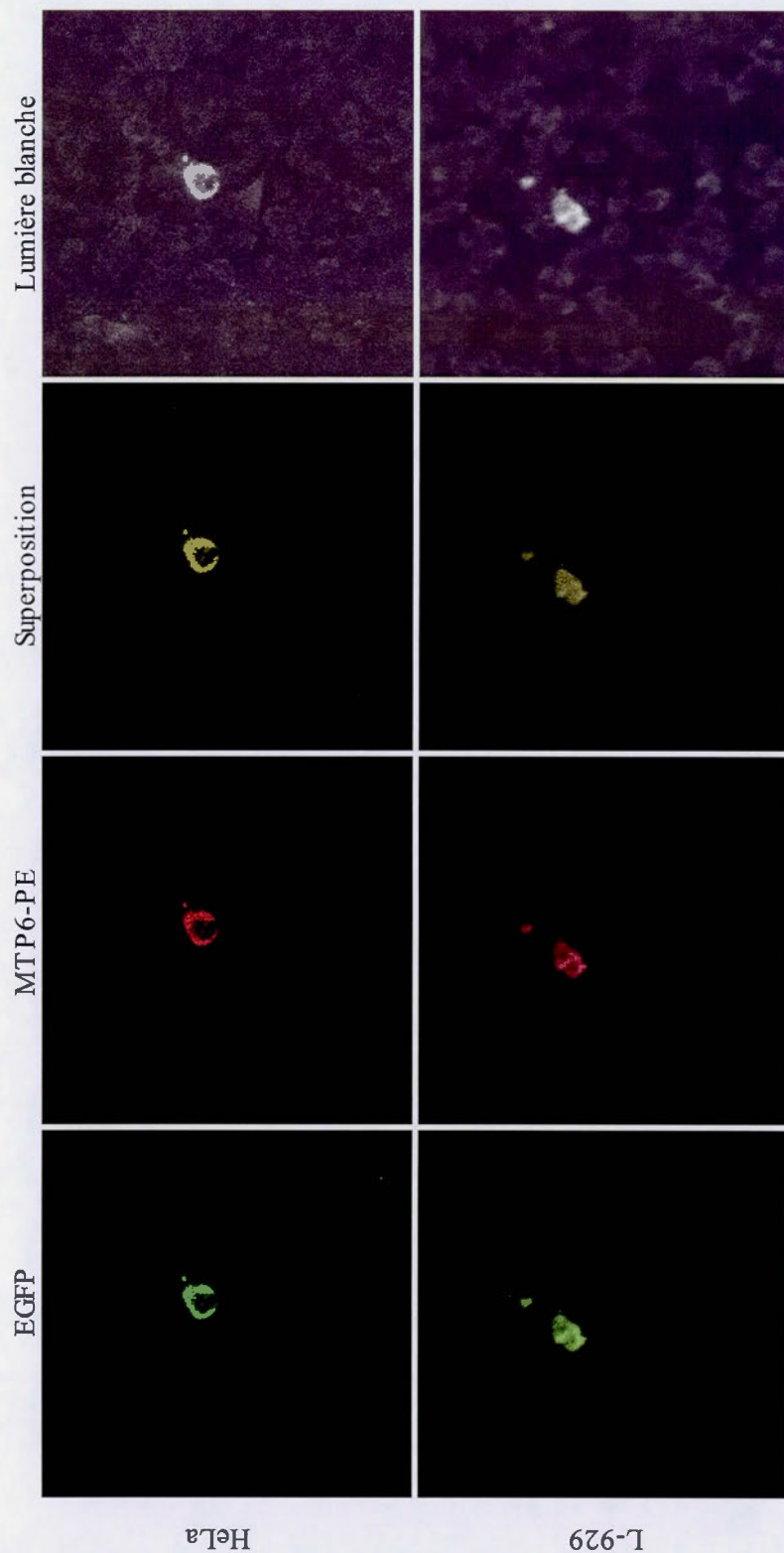


Figure 5. Co-transfection des vecteurs $pL_6N_2-R_HS3H/ZF2-PL-EGFP$ et $pL_6N_2-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6$ sur les lignées cellulaires HeLa et L-929. L'induction simultanée de l'expression de EGFP et MTP6 a été effectuée avec 100 nM de AP21967. La détection de la protéine M a été réalisée par immunofluorescence indirecte et détection de la fluorescence rouge en microscopie confocale, tandis que la détection de la protéine EGFP a été faite par détection de la fluorescence verte en microscopie confocale 48 heures post-induction.

a) Toxicité de l'agent de transfection

b) Transfection du vecteur $pL_6N_2-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6$

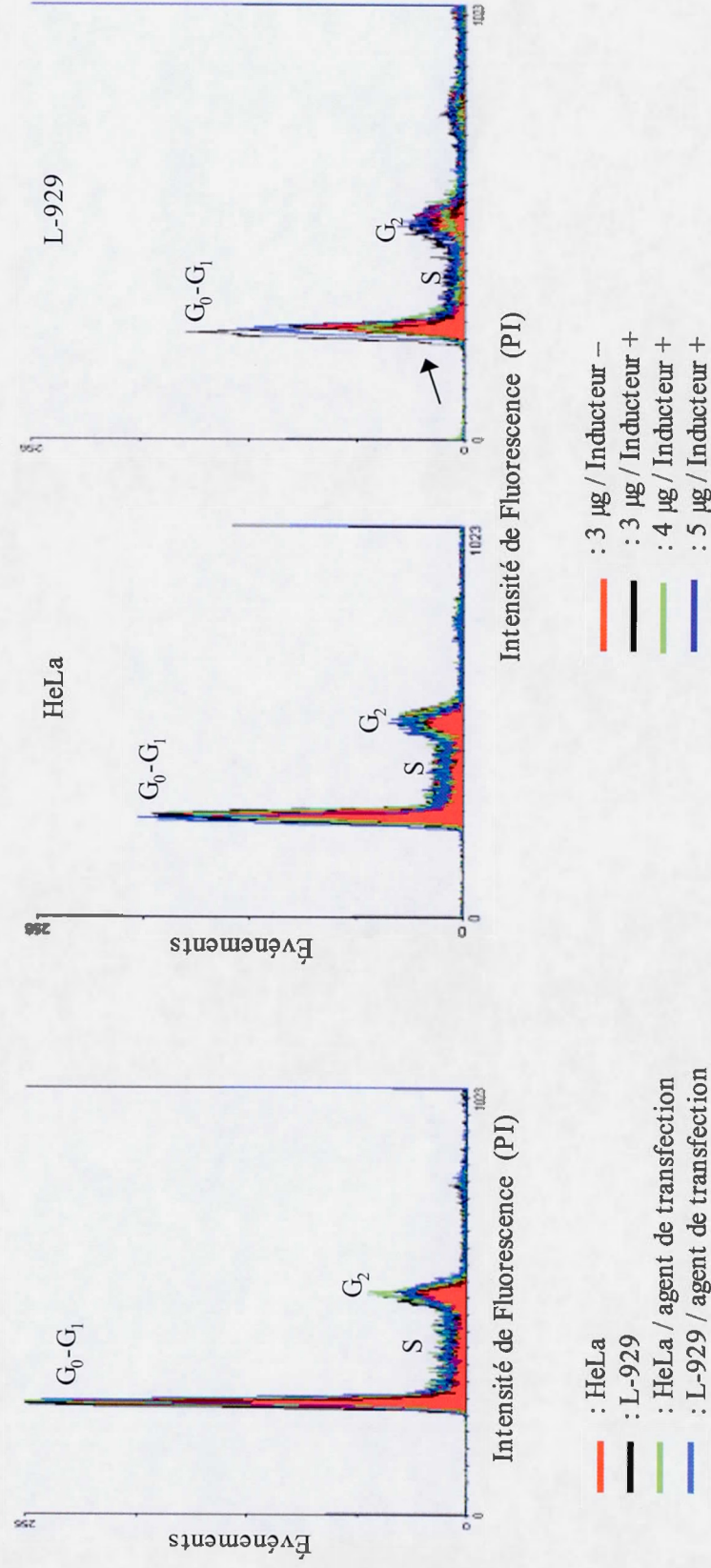


Figure 6. Évaluation de la toxicité de l'agent de transfection (a) et Évaluation du contenu en ADN des cellules après transfection du vecteur $pL_6N_2-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6$ (b) sur les lignées cellulaires HeLa et L-929. L'induction de l'expression de MTP6 a été effectuée avec 100 nM de AP21967. Les cellules post-induction ont été exposées à l'iode de propidium (PI) et analysées par cytométrie en flux. La flèche indique une faible sous-population cellulaire ayant un contenu en ADN sub- G_0-G_1 .

cellules seulement exprime la protéine, des lignées cellulaires stables ont été créées par électroporation. Ainsi, les lignées HeLa, NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras* ont été électroporées avec les vecteurs pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 ou pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MT1026 selon le cas. Une vingtaine de clones par lignée cellulaire et par vecteur ont été sélectionnés pour une étude plus approfondie.

3.5.1 Évaluation de la viabilité des clones stables de la lignée cellulaire HeLa

La viabilité des clones de la lignée cellulaire HeLa lors de l'expression de la protéine M a été évaluée par comptes cellulaires et exclusion au bleu de Trypan. L'hypothèse au départ était que l'apoptose, induite par l'expression de la protéine M, devrait se traduire par une diminution de la viabilité des cellules étudiées. Ainsi, la lignée cellulaire HeLa a été électroporée avec le vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 et des clones stables de cette lignée ont été utilisés afin de réaliser les essais de viabilité. L'expression de la protéine M a été induite à partir de différentes concentrations d'inducteur variant de 0 à 25 nM pour la majorité des clones, et de 0 à 500 nM pour un clone en particulier, qui présentait des caractéristiques de croissance différentes. La viabilité des clones a été évaluée à 48 heures post-induction (Figure 7). Les résultats ont été présentés de manière à traduire la baisse de viabilité en pourcentage de mortalité.

Ainsi, les résultats obtenus montrent une variation d'un clone à l'autre, notamment dans la mortalité en fonction de la concentration d'inducteur utilisée. De plus, il est possible de constater un taux basal de mortalité chez tous les clones, ce même en absence d'inducteur alors que la protéine M ne devrait pas être exprimée. Ce résultat peut cependant être expliqué en partie par le fait qu'il existe toujours une faible fraction de la population cellulaire qui est en apoptose, comme en témoigne le témoin négatif (HeLa C-) composé de cellules HeLa non électroporées. Les clones HeLa MTP6 C26 et HeLa MTP6 C27 semblent répondre à l'inducteur de manière peu efficace et l'on peut constater une variation dans la mortalité d'une concentration d'inducteur à une autre, indiquant que ces clones ne semblent pas montrer une perte de viabilité dose-dépendante. Le clone HeLa MTP6 C19 apparaît présenter une mortalité dose-dépendante en fonction de la concentration d'inducteur utilisée. De plus,

Clones de la lignée cellulaire HeLa

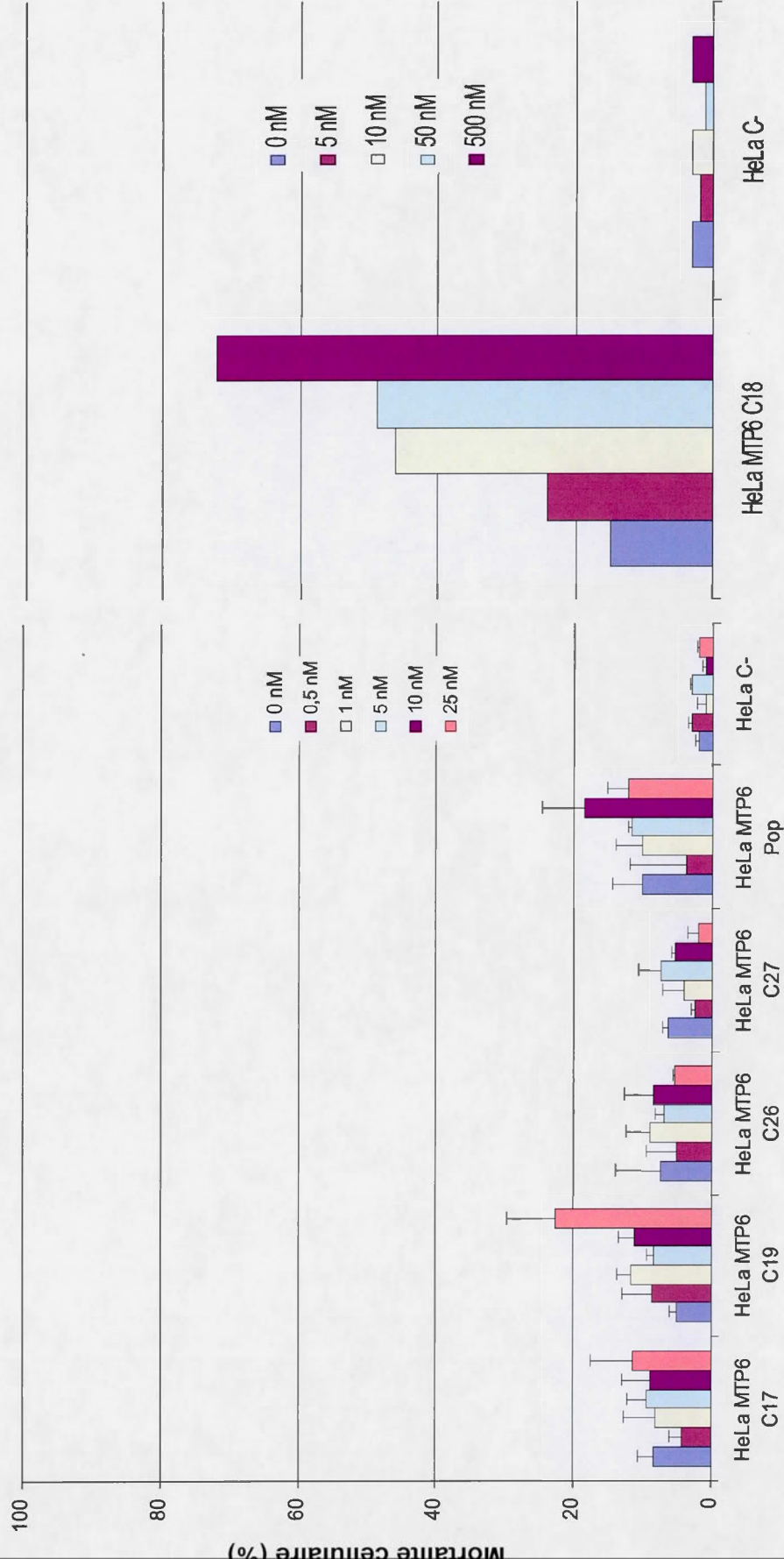


Figure 7. Évaluation de la viabilité des clones 17, 18, 19, 26, 27 et d'une population de clones (Pop) de la lignée cellulaire stable HeLa ayant été transfectée avec le vecteur pL₆N₂-R_hS3H/ZF2-PL-MTP6. L'induction de l'expression de MTP6 a été effectuée avec 0,5, 1, 5, 10 et 25 nM de AP21967 respectivement. Des concentrations d'inducteur de 5, 10, 50 et 500 nM ont été utilisées pour le clone 18. L'évaluation de la viabilité a été déterminée par coloration et exclusion au bleu de Trypan et compte cellulaire en microscopie optique 48 heures post-induction.

ce clone est celui présentant la mortalité la plus élevée, avec 22%, pour une concentration d'inducteur de 25 nM. Cette mortalité ne peut être attribuable à la présence de l'inducteur seul si l'on compare au témoin HeLa C-. Elle demeure néanmoins faible pour un clone stable où toutes les cellules devraient exprimer le gène M. Le clone HeLa MTP6 C18, à cause de ses caractéristiques morphologiques particulières intéressantes, a été exposé à des concentrations en inducteur plus élevées, allant jusqu'à 500 nM. Malheureusement, aussi à cause de ces caractéristiques, le clone n'a pu être maintenu et l'expérience n'a été effectuée qu'une fois. D'abord, les résultats montrent que la mortalité est plus élevée chez ce clone comparativement aux autres clones HeLa, même à de faibles concentrations d'inducteur. Ensuite, la mortalité de ce clone semble davantage dose-dépendante que le clone HeLa MTP6 C19, puisque la mortalité augmente en fonction de la concentration d'inducteur utilisée. Effectivement, le clone HeLa MTP6 C19 affiche une mortalité de 8 et 11% respectivement pour les concentrations d'inducteur 5 et 10 nM, alors que le clone HeLa MTP6 C18 affiche 24 et 46% pour ces mêmes concentrations. La mortalité du clone atteint jusqu'à 72% à une concentration de 500 nM d'inducteur. Une fois de plus, cette mortalité ne peut être attribuable à un effet quelconque de l'inducteur si l'on compare avec le témoin HeLa C-. Pour ce qui est de l'échantillon HeLa MTP6 Pop, soit la population de clones maintenue en culture, la mortalité varie beaucoup d'une concentration d'inducteur à une autre, ce qui représente bien la situation générale, considérant que les clones 17, 18, 19, 26 et 27 s'y retrouvent. Les résultats obtenus avec les clones 18 et 19, dans une moindre mesure pour ce dernier, suggèrent que la protéine M est exprimée de manière relativement dose-dépendante et que son expression mène à une augmentation de la mortalité des cellules chez qui cette protéine pro-apoptotique est exprimée.

3.5.2 Évaluation de la viabilité des clones stables des lignées NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras*

Afin de vérifier si l'effet cytotoxique de la protéine M se répète chez d'autres lignées cellulaires, deux autres lignées ont été utilisées afin d'évaluer leur viabilité après induction de l'expression de M, en l'occurrence les lignées NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras*. Les lignées NIH 3T3 sont des lignées fibroblastiques murines et la lignée NIH 3T3 *Ras* possède une mutation au niveau de l'oncogène *Ras*, faisant de celle-ci une lignée transformée lui conférant un

phénotype différent de la lignée NIH 3T3 originale. Un des objectifs de départ était d'utiliser la protéine M afin de provoquer l'apoptose chez des cellules transformées pouvant éventuellement mener au cancer. La comparaison de la viabilité après induction de l'expression de M chez ces deux lignées devrait permettre d'éclaircir la possibilité d'atteindre un tel objectif. Cette fois, en plus d'utiliser la protéine MTP6, la protéine MT1026 a également été utilisée. Selon notre hypothèse, la protéine MT1026 devrait aussi provoquer l'apoptose après induction de l'expression, mais dans un intervalle de temps plus élevé que la protéine MTP6. Ainsi, les vecteurs pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 et pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MT1026 ont été respectivement électroporés dans les lignées cellulaires NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras*. Des clones stables de ces lignées ont été utilisés afin de réaliser les essais de viabilité. L'expression de la protéine M a été induite à partir de différentes concentrations d'inducteur variant de 0 à 500 nM. La viabilité des clones a été évaluée à 4 heures et 12 heures post-induction par comptes cellulaires et exclusion au bleu de Trypan ou coloration au PI et cytométrie en flux. L'évaluation de la viabilité des clones NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras* a été réalisée plus tôt post-induction que chez les clones HeLa, en raison de la perte d'adhérence précoce des clones NIH 3T3. L'aspect morphologique des clones NIH 3T3 dans le temps a également été évalué par microscopie optique.

Ainsi, pour les clones NIH 3T3 MTP6 C4 et NIH 3T3 MTP6 C6 il est possible de constater une nette diminution dans la viabilité des cellules entre 4 et 12 heures post-induction de l'expression de M (Figures 8a, 8b, 9a et 9b). De plus, pour le clone NIH 3T3 MTP6 C4 à 12 heures post-induction, un nombre important de cellules ont perdu leur adhérence au plat de pétri et les cellules présentent une morphologie très différente des cellules à 4 heures. Cette perte d'adhérence et ces changements morphologiques pourraient être attribués à l'expression de la protéine M, car le témoin négatif ne présente pas de tels changements, malgré une exposition à une concentration d'inducteur de 500 nM. L'expression de la protéine M semble plus ou moins dose-dépendante chez ces clones, car les différentes concentrations d'inducteur utilisées ont mené aux mêmes résultats, soit une baisse de la viabilité dans le temps durant l'expression de M. En ce qui concerne le clone NIH 3T3 MT1026 C4 (Figures 10a et 10b), déjà à 4 heures post-induction certaines cellules montrent un changement morphologique et ne semblent plus viables et à 12 heures post-induction les

NIH 3T3 MTP6 C4

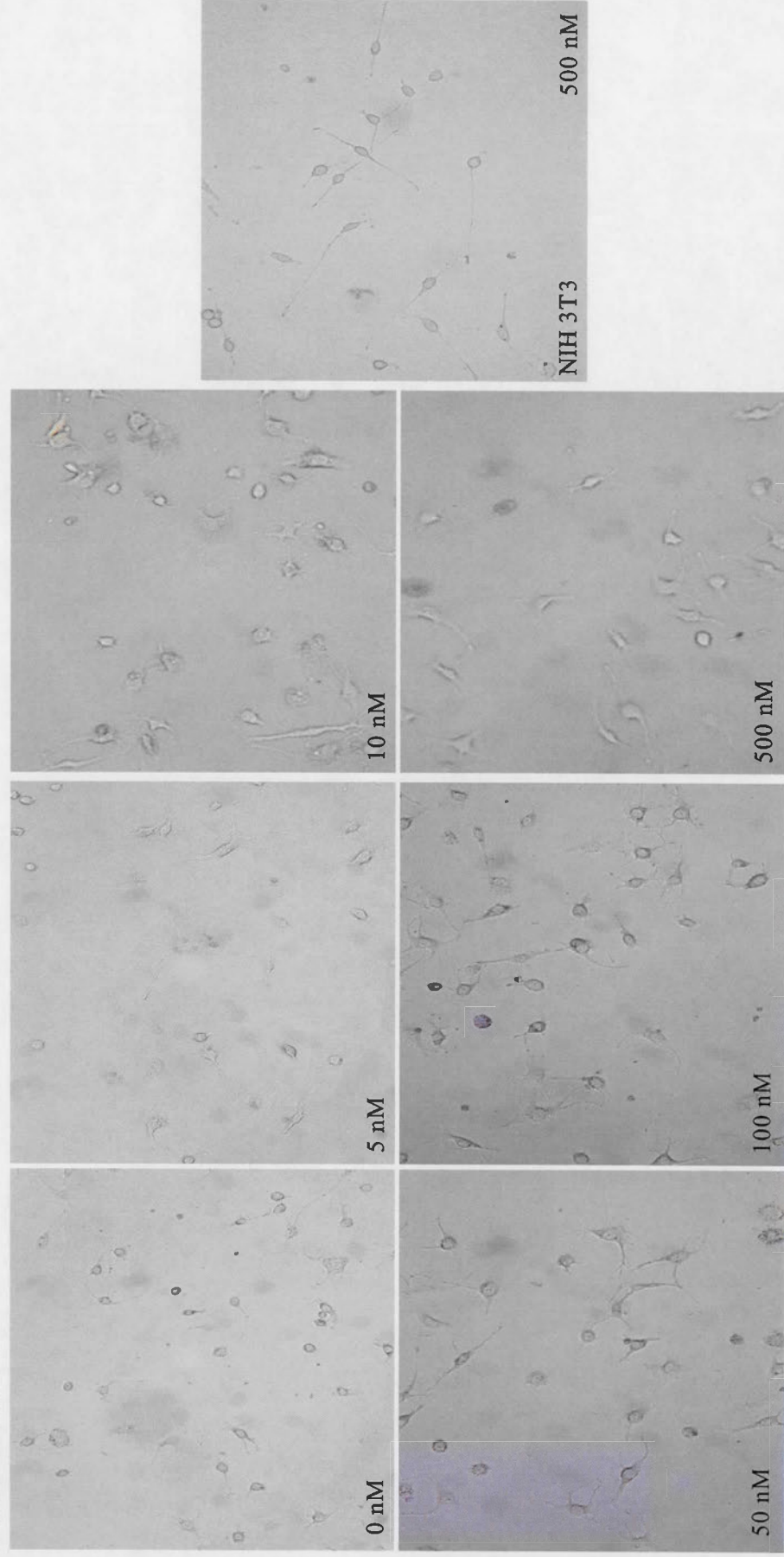


Figure 8a. Évaluation de la viabilité du clone 4 de la lignée cellulaire stable NIH 3T3 ayant été transfectée avec le vecteur pL₆N₂-R₄S3H/ZF2-PL-MTP6. L'induction de l'expression de MTP6 a été effectuée avec 0, 5, 10, 50, 100 et 500 nM de AP21967 respectivement. L'évaluation de la viabilité a été déterminée par coloration au bleu de trypan et microscopie optique 4 heures post-induction. Des cellules NIH 3T3 non transfectées ont également été exposées à 500 nM d'inducteur (photo de droite).

NIH 3T3 MTP6 C4

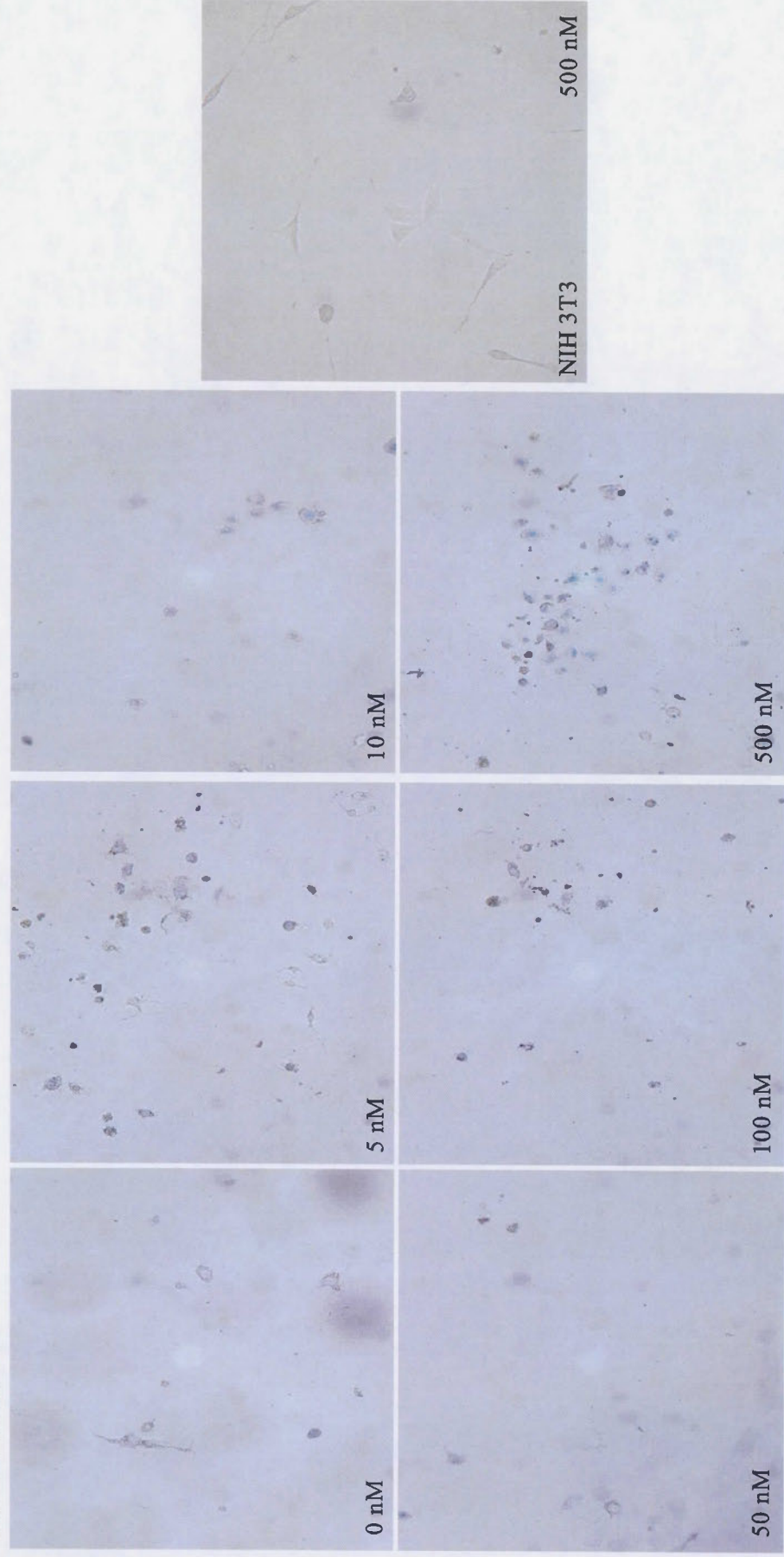


Figure 8b. Évaluation de la viabilité du clone 4 de la lignée cellulaire stable NIH 3T3 ayant été transfectée avec le vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6. L'induction de l'expression de MTP6 a été effectuée avec 0, 5, 10, 50, 100 et 500 nM de AP21967 respectivement. L'évaluation de la viabilité a été déterminée par coloration au bleu de trypan et microscopie optique 12 heures post-induction. Des cellules NIH 3T3 non transfectées ont également été exposées à 500 nM d'inducteur (photo de droite).

NIH 3T3 MTP6 C6

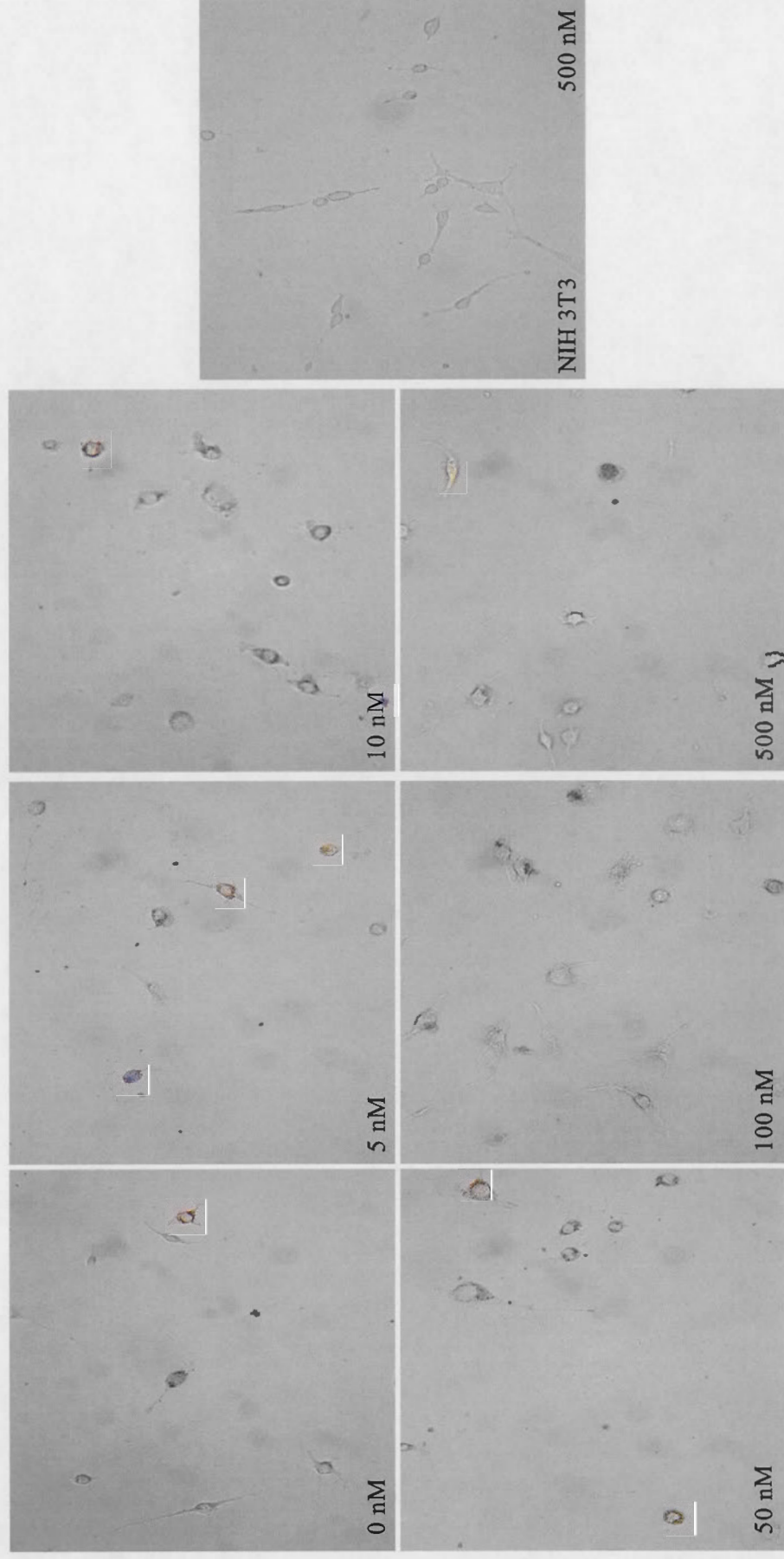


Figure 9a. Évaluation de la viabilité du clone 6 de la lignée cellulaire stable NIH 3T3 ayant été transfectée avec le vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6. L'induction de l'expression de MTP6 a été effectuée avec 0, 5, 10, 50, 100 et 500 nM de AP21967 respectivement. L'évaluation de la viabilité a été déterminée par coloration au bleu de Trypan et microscopie optique 4 heures post-induction. Des cellules NIH 3T3 non transfectées ont également été exposées à 500 nM d'inducteur (photo de droite).

NIH 3T3 MTP6 C6

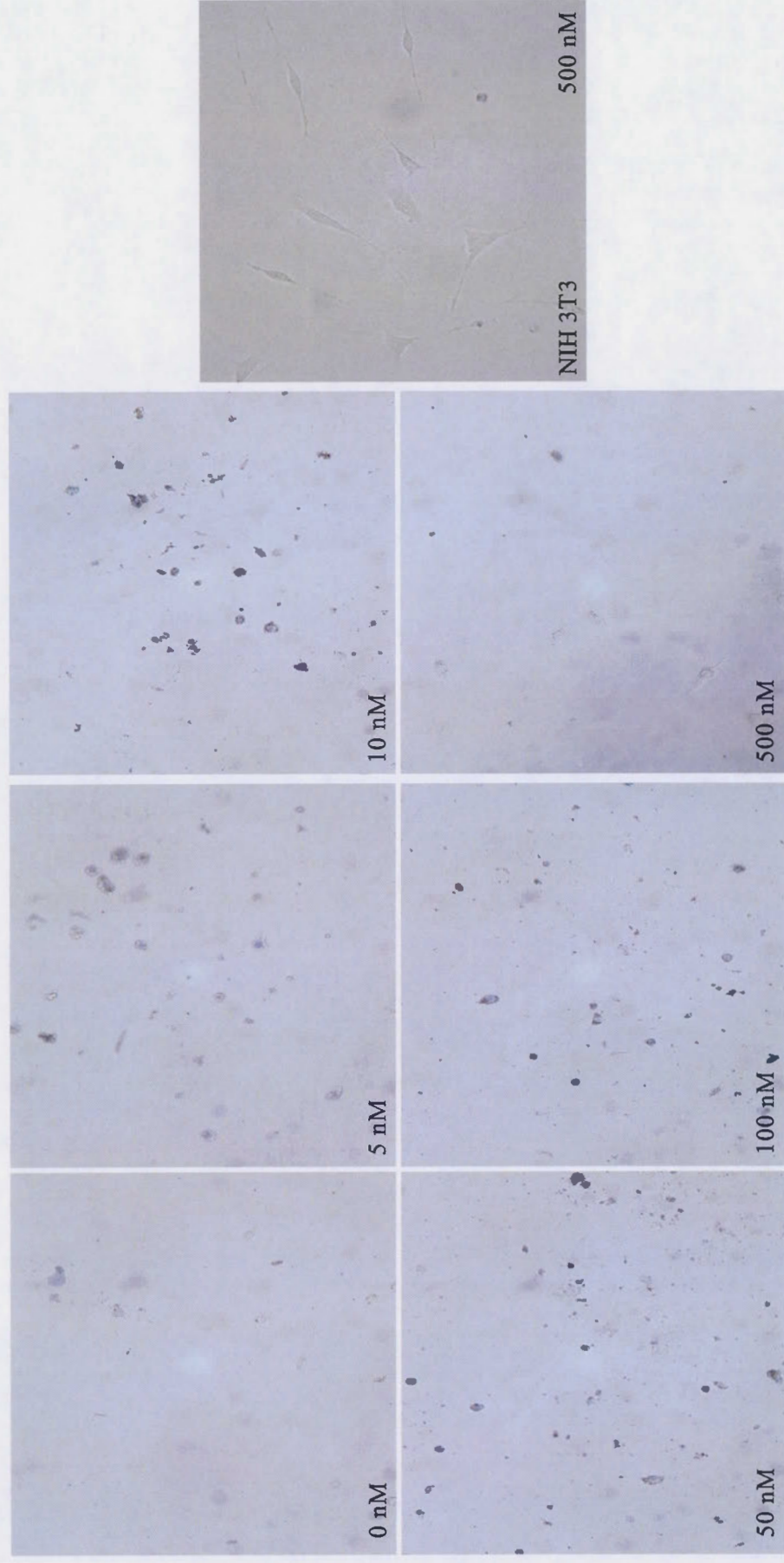


Figure 9b. Évaluation de la viabilité du clone 6 de la lignée cellulaire stable NIH 3T3 ayant été transfectée avec le vecteur pL₆N₂-R_{3H}/ZF2-PL-MTP6. L'induction de l'expression de MTP6 a été effectuée avec 0, 5, 10, 50, 100 et 500 nM de AP21967 respectivement. L'évaluation de la viabilité a été déterminée par coloration au bleu de Trypan et microscopie optique 12 heures post-induction. Des cellules NIH 3T3 non transfectées ont également été exposées à 500 nM d'inducteur (photo de droite).

NIH 3T3 MT1026 C4

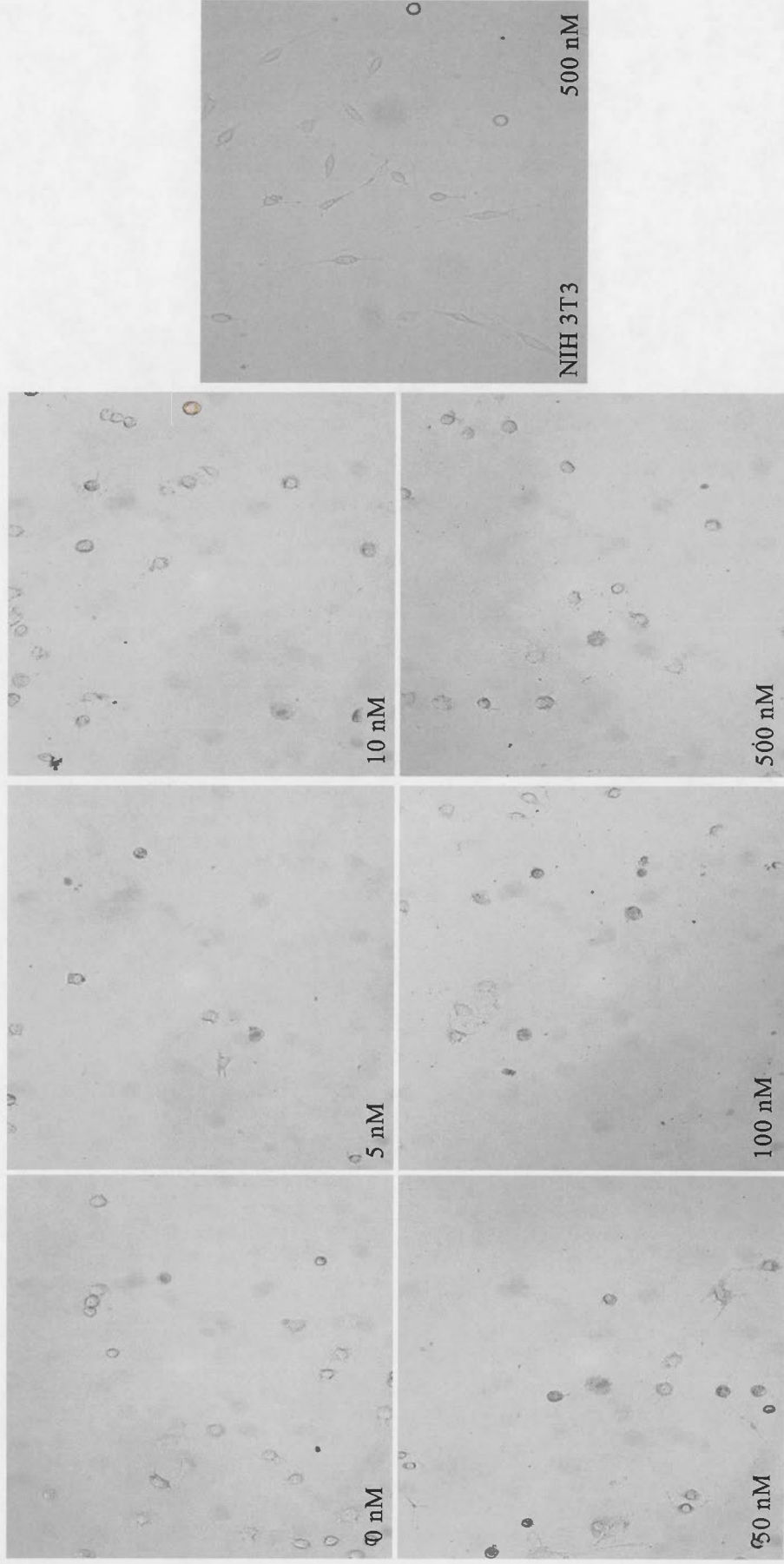


Figure 10a. Évaluation de la viabilité du clone 4 de la lignée cellulaire stable NIH 3T3 ayant été transfectée avec le vecteur pL₆N₂-R_H-S3H/ZF2-PL-MT1026. L'induction de l'expression de MT1026 a été effectuée avec 0, 5, 10, 50, 100 et 500 nM de AP21967 respectivement. L'évaluation de la viabilité a été déterminée par coloration au bleu de Trypan et microscopie optique 4 heures post-induction. Des cellules NIH 3T3 non transfectées ont également été exposées à 500 nM d'inducteur (photo de droite).

NIH 3T3 MT1026 C4

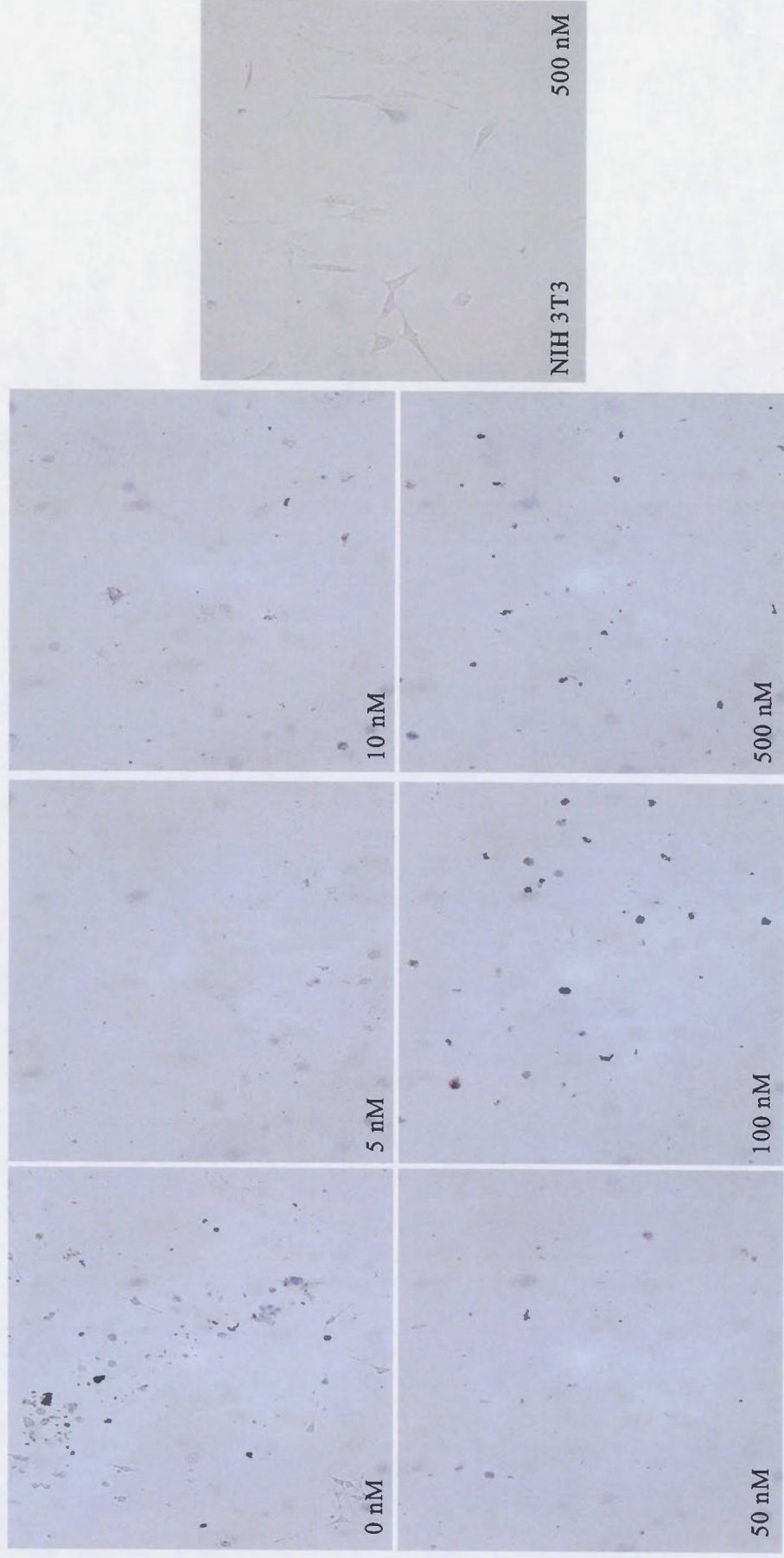


Figure 10b. Évaluation de la viabilité du clone 4 de la lignée cellulaire stable NIH 3T3 ayant été transfectée avec le vecteur pL₆N₂-R_{HT}S3H/ZF2-PL-MT1026. L'induction de l'expression de MT1026 a été effectuée avec 0, 5, 10, 50, 100 et 500 nM de AP21967 respectivement. L'évaluation de la viabilité a été déterminée par coloration au bleu de Trypan et microscopie optique 12 heures post-induction. Des cellules NIH 3T3 non transfectées ont également été exposées à 500 nM d'inducteur (photo de droite).

cellules sont presque toutes décollées ou non viables. Une fois de plus cependant, l'effet ne semble pas dose-dépendant et il apparaît que malgré l'absence d'inducteur, il y a présence de mortalité à 12 heures post-induction, ce qui pourrait être expliqué par une expression basale de la protéine M en absence d'inducteur. Pour ce qui est du clone NIH 3T3 MT1026 C6 (Figures 11a et 11b), à 4 heures post-induction, il y a déjà la présence de cellules non viables, mais celles-ci sont beaucoup plus nombreuses à 12 heures post-induction. Comparativement aux autres clones, à 12 heures post-induction, malgré la non viabilité, les cellules ne se sont pas décollées de la surface de culture, mais des changements morphologiques majeurs, pouvant être attribués à l'expression de M, sont apparents. De plus, contrairement aux autres clones, le clone NIH 3T3 MT1026 C6 semble montrer une expression de la protéine M dose-dépendante, car il est possible de remarquer une diminution de la viabilité des cellules en fonction de l'augmentation de la concentration d'inducteur. Cette diminution de viabilité n'est pas causée par un effet délétère de l'inducteur, puisque les cellules témoin montrent une excellente viabilité à 12 heures post-induction malgré la présence d'une concentration d'inducteur de 500 nM. Pour le clone NIH 3T3 *Ras* MT1026 C6 (Figures 12a et 12b), seules les concentrations d'inducteur 50, 100 et 500 nM montrent une diminution de la viabilité à 4 heures post-induction. Le phénomène se poursuit à 12 heures post-induction avec une diminution de la viabilité plus marquée pour les mêmes concentrations, et une diminution de l'adhérence des cellules sans changements morphologiques de celles-ci toutefois. Ce clone semble exprimer la protéine M seulement à de fortes concentrations d'inducteur, et ne semble pas montrer d'expression basale à faible concentration d'inducteur.

Les résultats de viabilité pour les clones stables NIH 3T3 ont été représentés sous forme graphique en terme de pourcentage de mortalité cellulaire afin de pouvoir comparer les différents clones entre eux (Figure 13). Les résultats obtenus montrent qu'il y a une différence considérable entre la mortalité observée à 4 heures post-induction et celle obtenue à 12 heures post-induction de l'expression de M, et ce phénomène est présent chez tous les clones. À 4 heures post-induction, un seul des clones montre un pourcentage de mortalité supérieur à 25%. À 12 heures post-induction, les clones NIH 3T3 MTP6 C4, NIH 3T3 MTP6 C6 et NIH 3T3 MT1026 C6 semblent montrer une expression plutôt dose-dépendante de la protéine M, avec quelques variations selon les concentrations utilisées. Le clone NIH 3T3

NIH 3T3 MT1026 C6

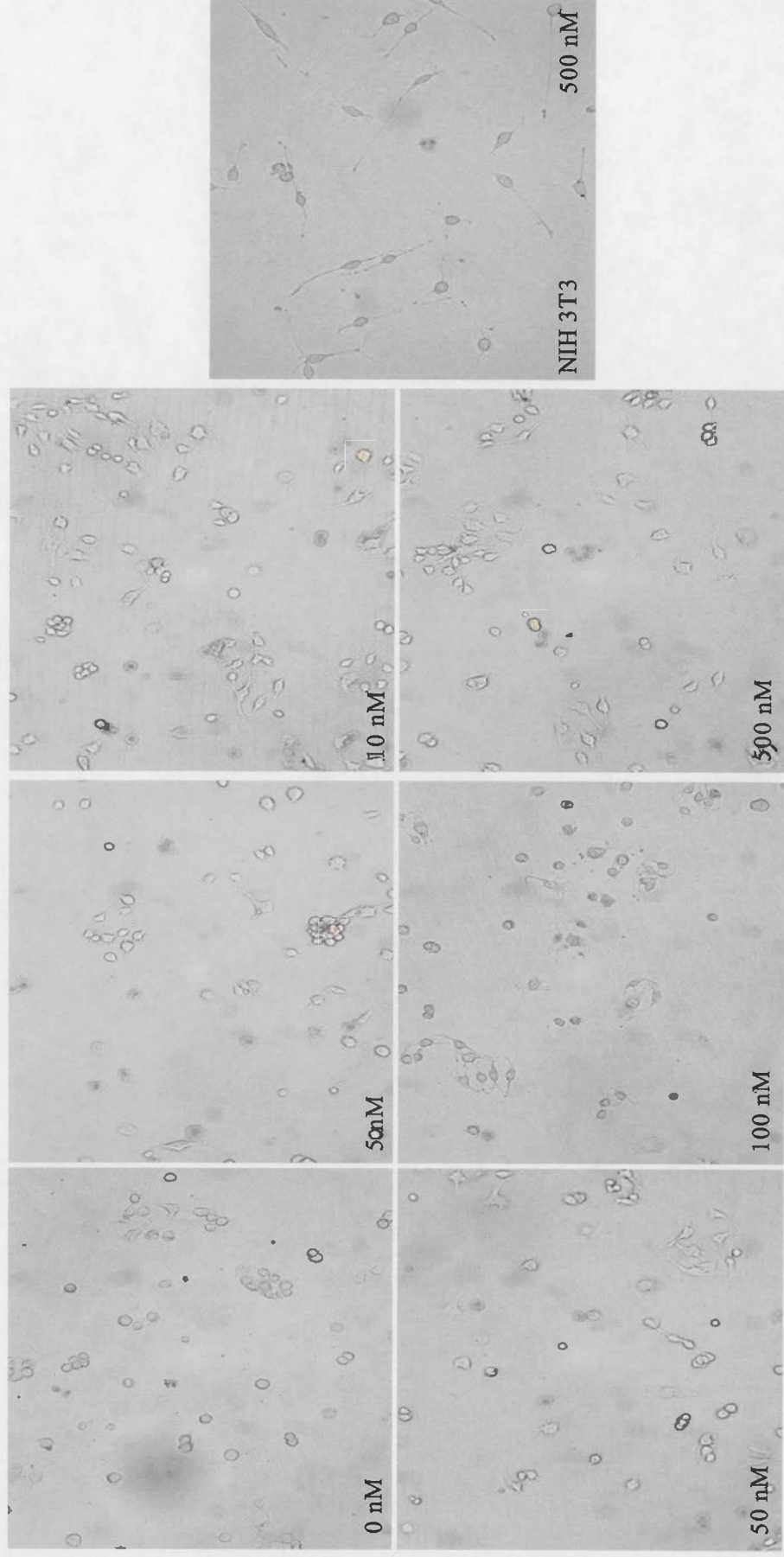


Figure 11a. Évaluation de la viabilité du clone 6 de la lignée cellulaire stable NIH 3T3 ayant été transfectée avec le vecteur pL₆N₂-R_hS3H/ZF2-PL-MT1026. L'induction de l'expression de MT1026 a été effectuée avec 0, 5, 10, 50, 100 et 500 nM de AP21967 respectivement. L'évaluation de la viabilité a été déterminée par coloration au bleu de Trypan et microscopie optique 4 heures post-induction. Des cellules NIH 3T3 non transfectées ont également été exposées à 500 nM d'inducteur (photo de droite).

NIH 3T3 MT1026 C6

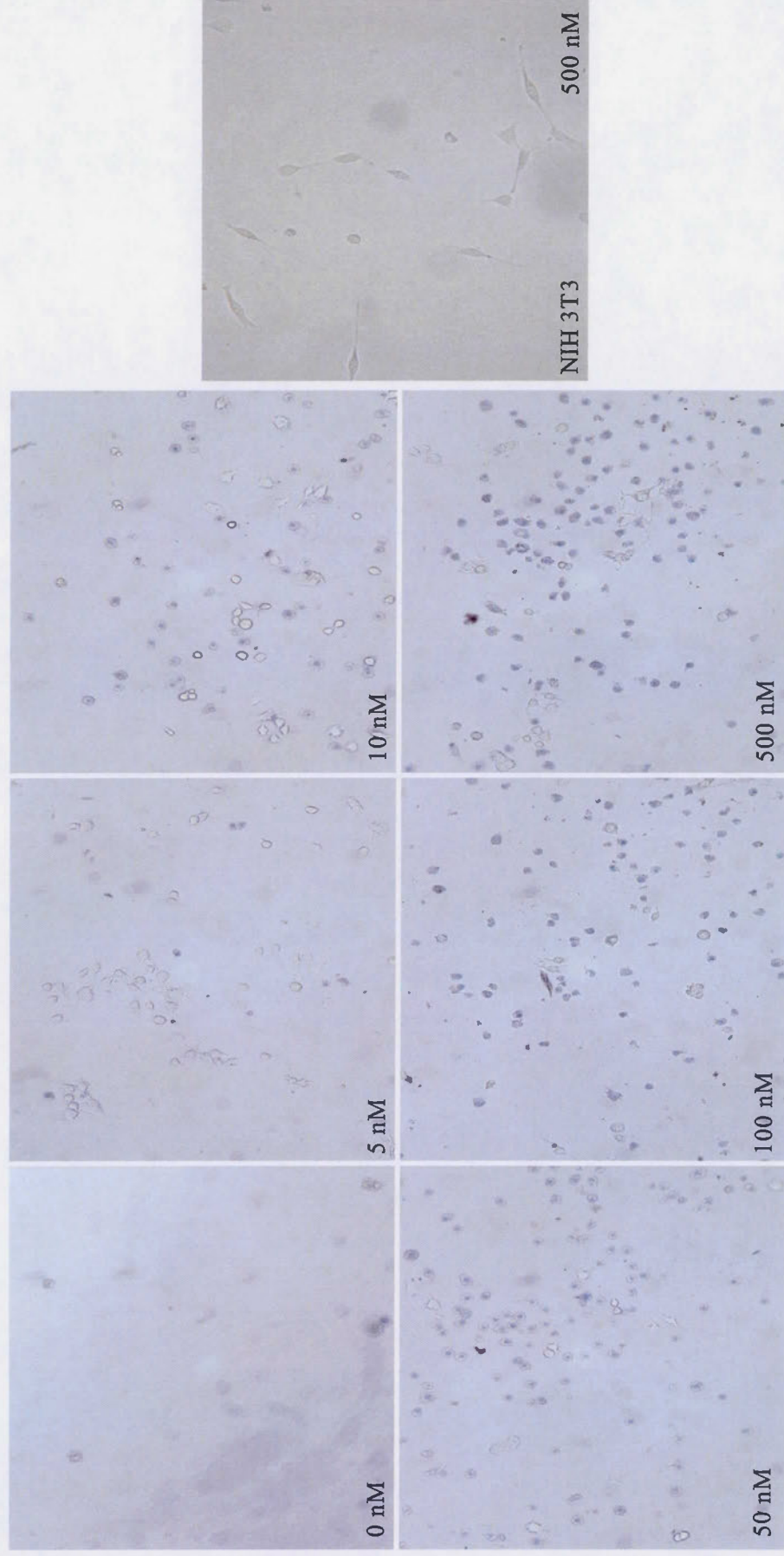


Figure 11b. Évaluation de la viabilité du clone 6 de la lignée cellulaire stable NIH 3T3 ayant été transfectée avec le vecteur pL₆N₂-R_hS3H/ZF2-PL-MT1026. L'induction de l'expression de MT1026 a été effectuée avec 0, 5, 10, 50, 100 et 500 nM de AP21967 respectivement. L'évaluation de la viabilité a été déterminée par coloration au bleu de Trypan et microscopie optique 12 heures post-induction. Des cellules NIH 3T3 non transfectées ont également été exposées à 500 nM d'inducteur (photo de droite).

NIH 3T3 *Ras* MT1026 C6

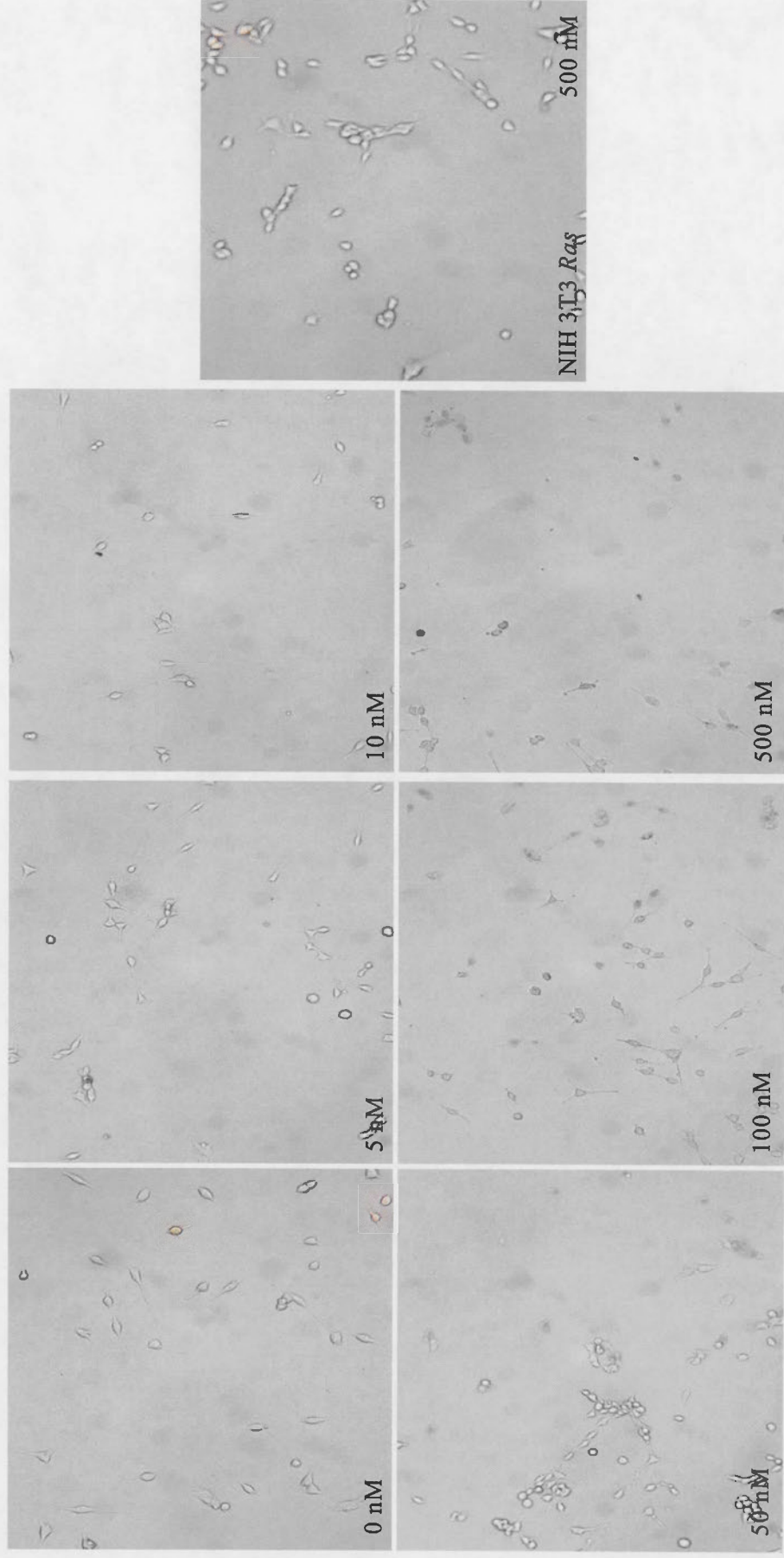


Figure 12a. Évaluation de la viabilité du clone 6 de la lignée cellulaire stable NIH 3T3 *Ras* ayant été transfectée avec le vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MT1026. L'induction de l'expression de MT1026 a été effectuée avec 0, 5, 10, 50, 100 et 500 nM de AP21967 respectivement. L'évaluation de la viabilité a été déterminée par coloration au bleu de Trypan et microscopie optique 4 heures post-induction. Des cellules NIH 3T3 *Ras* non transfectées ont également été exposées à 500 nM d'inducteur (photo de droite).

NIH 3T3 *Ras* MT1026 C6

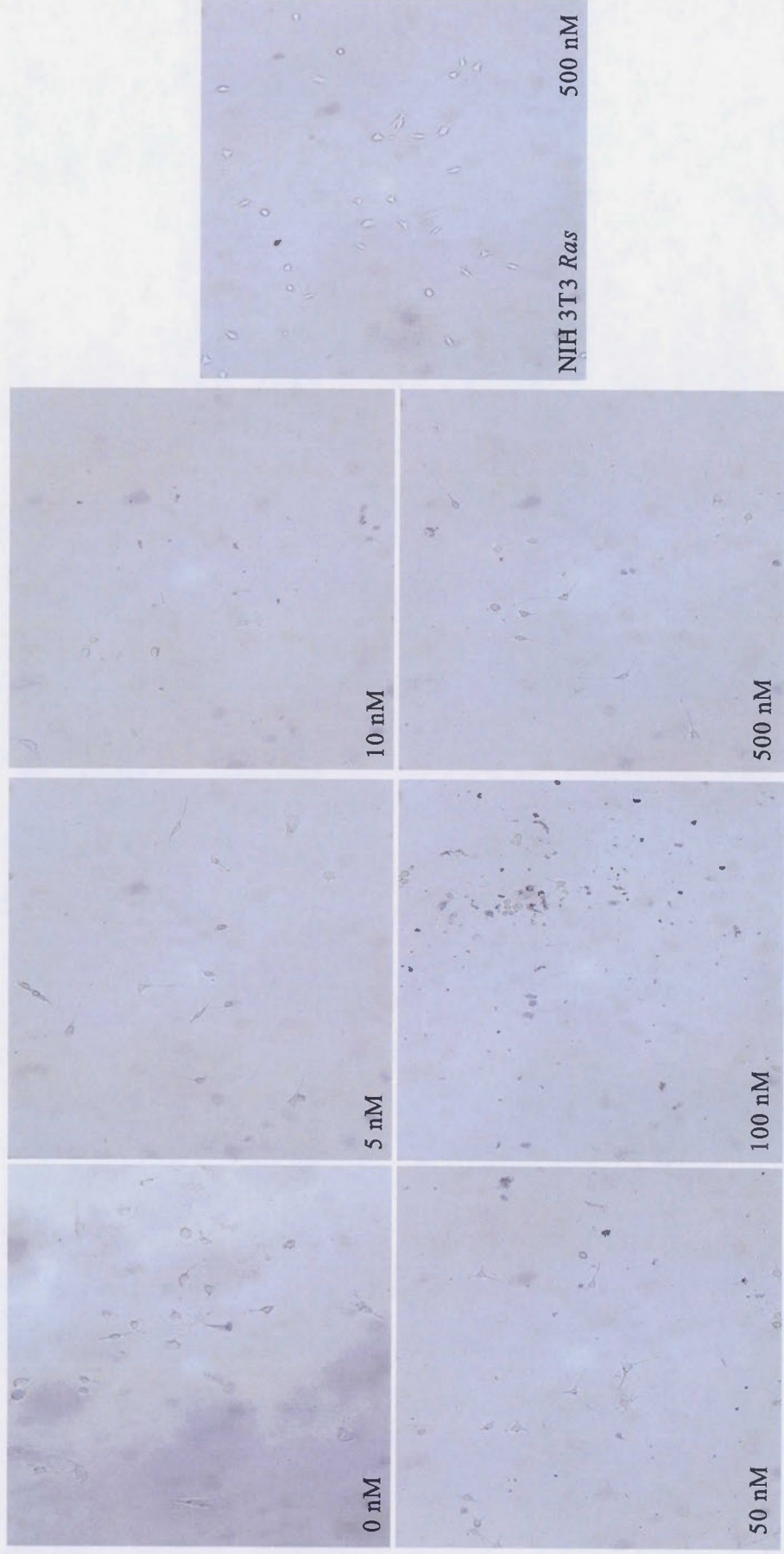


Figure 12b. Évaluation de la viabilité du clone 6 de la lignée cellulaire stable NIH 3T3 *Ras* ayant été transfectée avec le vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MT1026. L'induction de l'expression de MT1026 a été effectuée avec 0, 5, 10, 50, 100 et 500 nM de AP21967 respectivement. L'évaluation de la viabilité a été déterminée par coloration au bleu de Trypan et microscopie optique 12 heures post-induction. Des cellules NIH 3T3 *Ras* non transfectées ont également été exposées à 500 nM d'inducteur (photo de droite).

Clones de la lignée cellulaire NIH 3T3

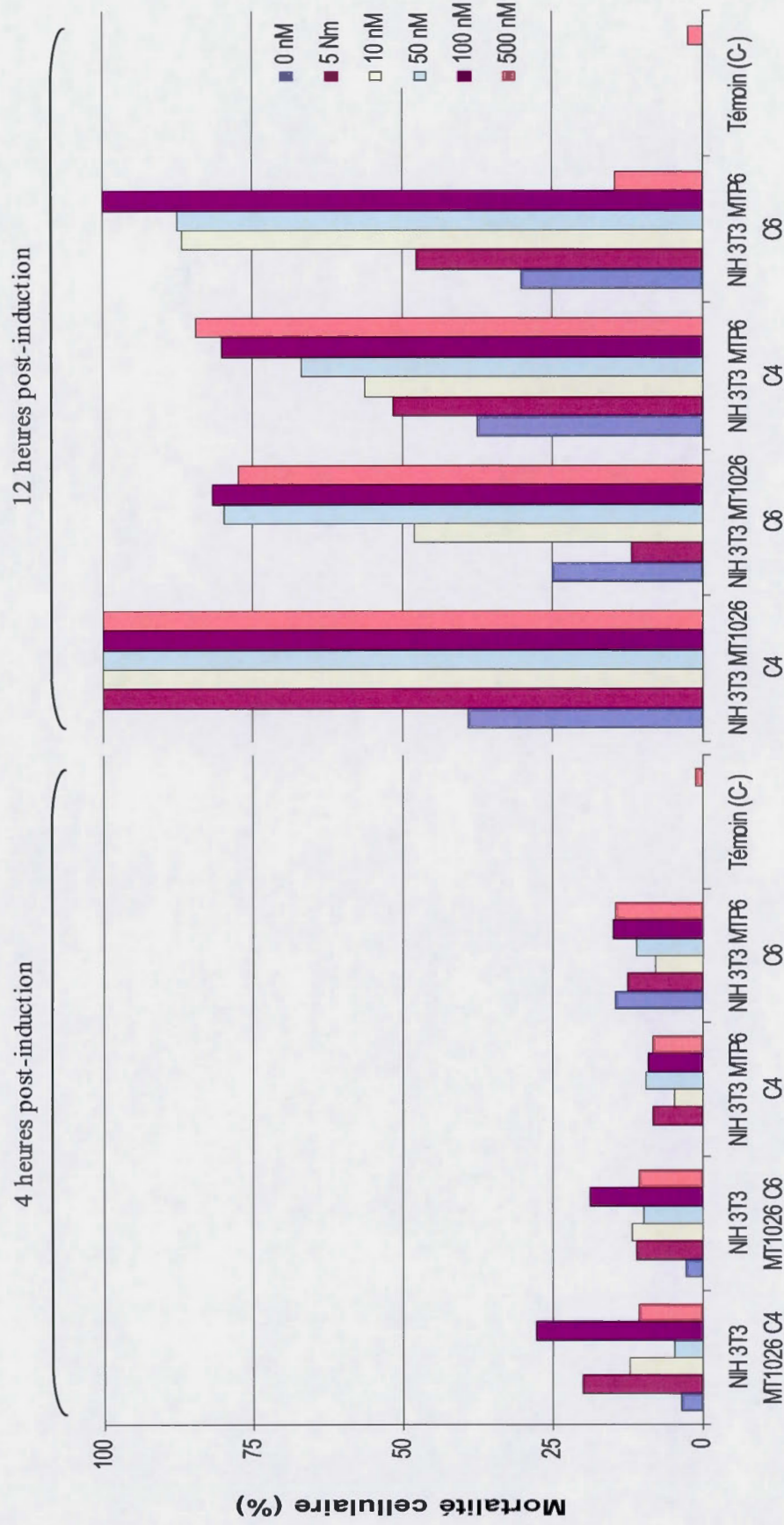


Figure 13. Évaluation de la viabilité des clones de la lignée cellulaire stable NIH 3T3 ayant été transfectée avec les vecteurs pL₆N₂-R_hS3H/ZF2-PL-MTP6 et pL₆N₂-R_hS3H/ZF2-PL-MT1026 respectivement. L'induction de l'expression de MTP6 et MT1026 a été effectuée avec 5, 10, 50, 100 et 500 nM de AP21967 respectivement. L'évaluation de la viabilité a été déterminée par coloration et exclusion au bleu de Trypan et compte cellulaire en microscopie optique à 4 heures et 12 heures post-induction.

MT1026 C4 atteint jusqu'à 100% de mortalité à 12 heures post-induction, et ce pour toutes les concentrations d'inducteur. En comparant les clones NIH 3T3 au témoin (C-), la mortalité des cellules ne peut être attribuée à l'inducteur, puisque le témoin a été exposé dans les mêmes conditions à la concentration d'inducteur la plus élevée, soit 500 nM. La mortalité semble donc attribuable à l'expression de la protéine M, qui a provoqué l'apoptose chez les cellules.

La viabilité des clones NIH 3T3 *Ras* a été évaluée à 4 heures et 12 heures post-induction. Afin d'optimiser les manipulations et de minimiser les biais d'interprétations, la viabilité des clones NIH 3T3 *Ras* a été évaluée par coloration au PI et cytométrie en flux. L'expression de la protéine M a été induite avec des concentrations d'inducteur variant de 0 à 500 nM, tout comme les clones NIH 3T3. Les résultats de viabilité ont été représentés sous forme graphique en terme de pourcentage de mortalité cellulaire afin de pouvoir comparer les clones entre eux (Figure 14). Les résultats montrent qu'il y a une différence entre la mortalité à 4 heures et à 12 heures, mais cette différence est nettement moins élevée que celle observée chez les clones NIH 3T3. Néanmoins, pour les clones NIH 3T3 *Ras* MT1026 C2 et NIH 3T3 *Ras* MT1026 C3, il y a une différence évidente, la mortalité augmente en fonction de la durée d'exposition à l'inducteur. En observant les résultats à 12 heures post-induction, il apparaît que les clones NIH 3T3 *Ras* MT1026 C2 et NIH 3T3 *Ras* MT1026 C3 montrent une plus forte mortalité et exprimeraient le mieux la protéine M par rapport à la concentration d'inducteur utilisée. Le clone NIH 3T3 *Ras* MTP6 C1 montre également une bonne réponse à l'inducteur, mais l'expression basale de M semble légèrement plus élevée et la réponse à l'inducteur à 4 heures post-induction semble irrégulière. Le clone NIH 3T3 *Ras* MTP6 C4 est celui qui semble le moins répondre à l'inducteur, montrant des résultats très similaires entre 4 heures et 12 heures post-induction. Comme la mortalité des clones NIH 3T3 *Ras* augmente entre 4 et 12 heures post-induction, la viabilité à 24 heures post-induction a été vérifiée chez deux de ces clones, afin de s'assurer qu'il n'y ait pas de décalage temporel dans l'observation des effets cytopathiques, sans toutefois constater de mortalité plus importante (Résultats non présentés). Bien que les clones NIH 3T3 *Ras* montrent une réponse à l'induction de la protéine M différente des clones NIH 3T3, il reste que la mortalité observée chez ceux-ci semble être attribuable à l'expression de M, tout comme c'était le cas pour les clones NIH

Clones de la lignée cellulaire NIH 3T3 *Ras*

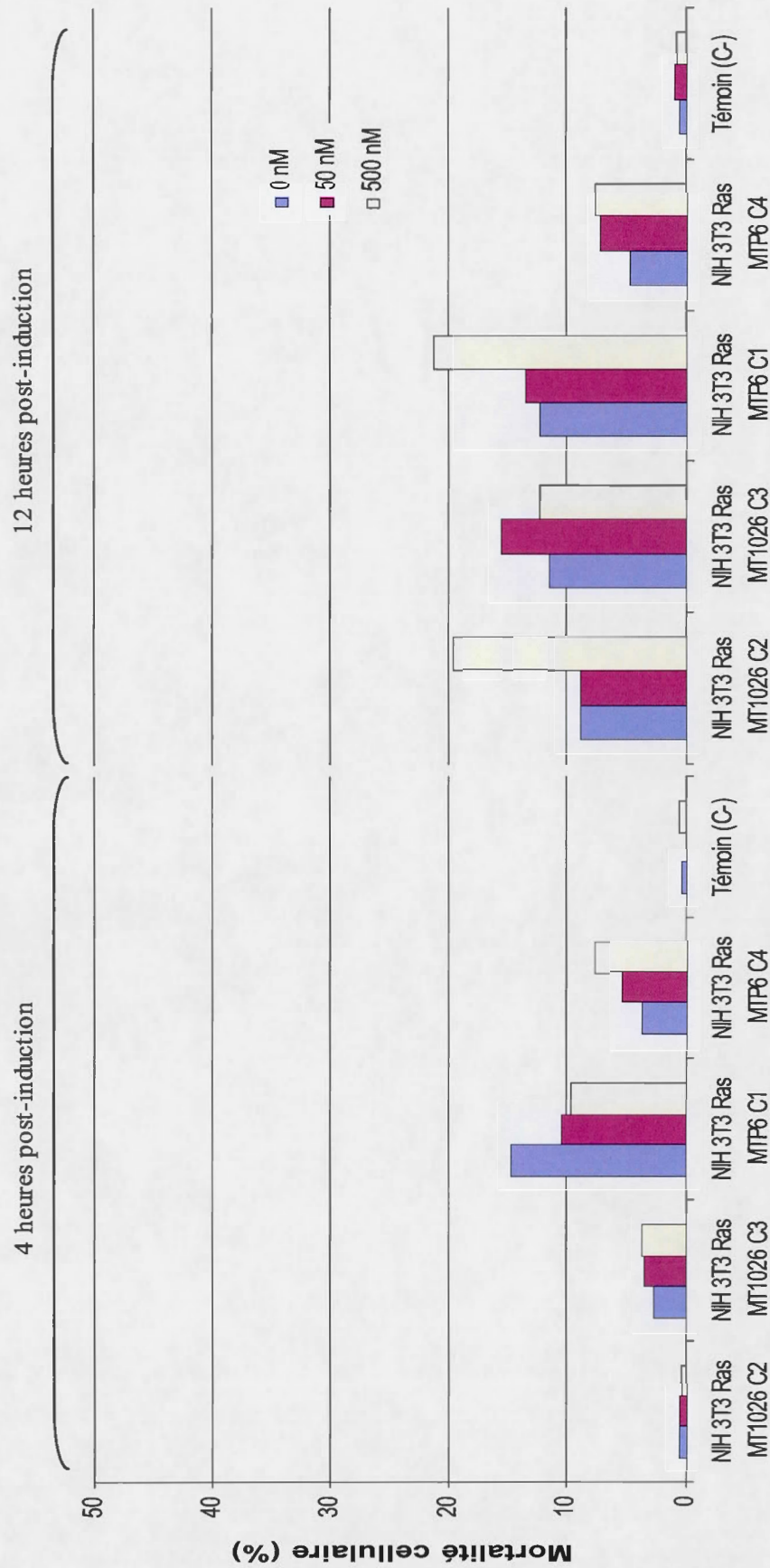


Figure 14. Évaluation de la viabilité des clones de la lignée cellulaire stable NIH 3T3 *Ras* ayant été transfectée avec les vecteurs pL₆N₂-R_hS3H/ZF2-PL-MTP6 et pL₆N₂-R_hS3H/ZF2-PL-MT1026 respectivement. L'induction de l'expression de MTP6 et MT1026 a été effectuée avec 50 et 500 nM de AP21967 respectivement. L'évaluation de la viabilité a été déterminée par coloration à l'iodure de propidium (PI) et cytométrie en flux à 4 heures et 12 heures post-induction.

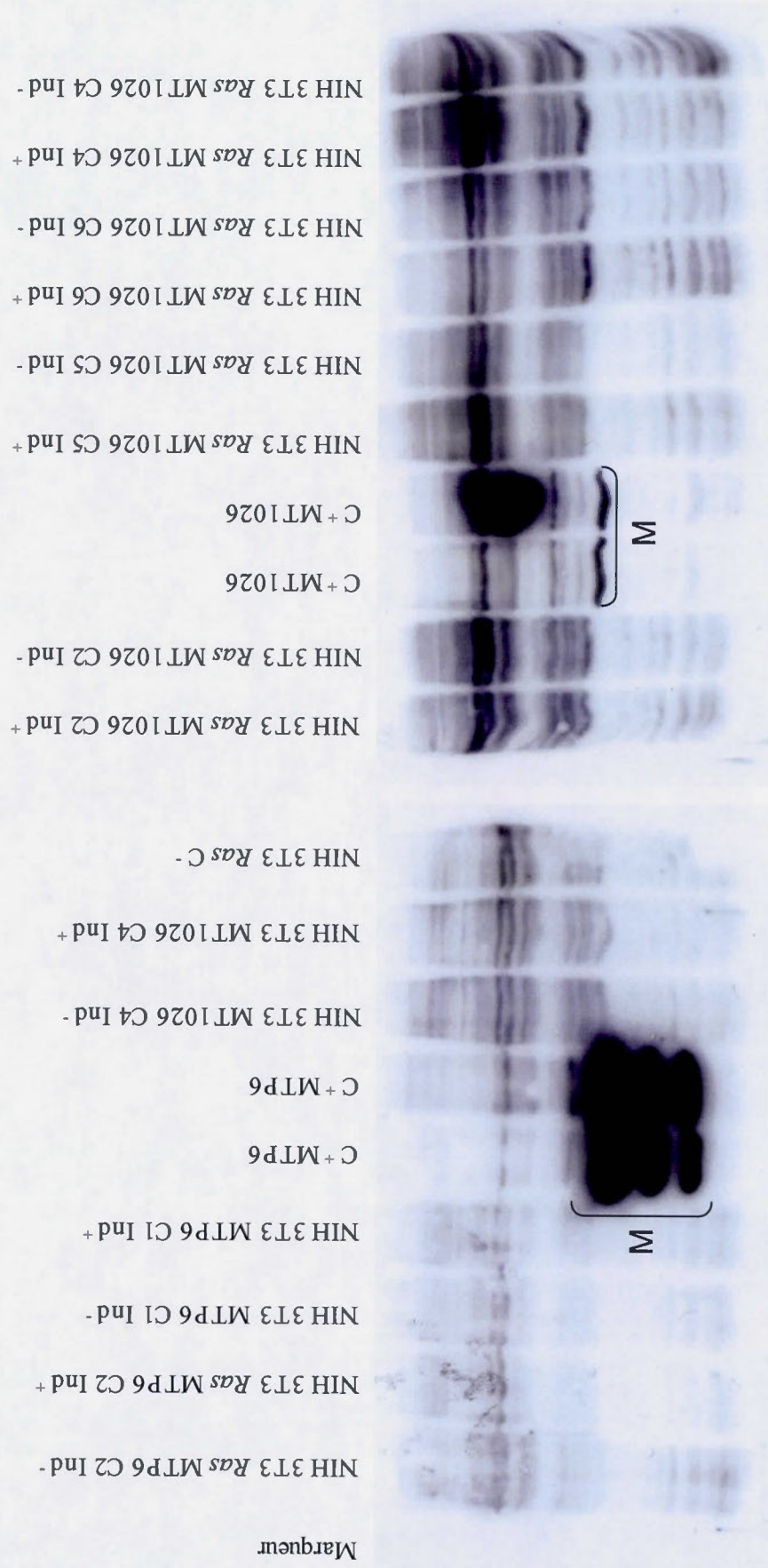
3T3, car le témoin négatif ne montre qu'une très faible mortalité malgré une exposition aux mêmes concentrations d'inducteur que les clones.

3.6 Détection de M par immunobuvardage chez les clones stables NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras*

Afin de confirmer que la diminution de la viabilité des clones est bien provoquée par la protéine M du VSV, un immunobuvardage des protéines MTP6 et MT1026 a été réalisé sur des clones NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras* à 24 heures après avoir induit l'expression de la protéine M avec une concentration d'inducteur de 100 nM. Les résultats obtenus ne permettent pas de confirmer la présence de la protéine MTP6 ou MT1026 dans les échantillons protéiques des clones, même après une surexposition des films (Figure 15). La comparaison avec les témoins positifs C⁺MTP6 et C⁺MT1026 a été obtenue à partir d'infections réalisées avec le VSV entier et exposés plus brièvement (Résultats non présentés). Cependant, ce résultat n'exclut pas la possibilité que la protéine M soit responsable des effets cytopathiques observés chez les clones, car la quantité de M requise afin d'observer ces effets reste à ce jour méconnue. Ainsi, il est possible que la quantité de M requise afin de provoquer des effets cytopathiques ne soit pas perceptible par cette méthode. De plus, la majorité des clones testés sont des clones NIH 3T3 *Ras* et il a été montré (Figure 14) que la mortalité est plus faible chez ceux-ci que chez les clones NIH 3T3. Ces facteurs réunis font probablement en sorte que la protéine M ne peut pas être détectée par immunobuvardage.

3.7 Détection de l'ARN_m de M par RT-PCR chez les clones stables NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras*

Étant donné que la protéine M n'a pas été détectée par immunobuvardage, une détection par RT-PCR de l'ARN_m du gène M a été effectuée sur ces mêmes clones NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras*, dans le but de vérifier si l'ARN_m du gène était transcrit (Figure 16). Les résultats obtenus montrent la détection d'une bande pouvant coïncider à l'ARN_m du gène M chez un seul des clones utilisés, soit NIH 3T3 *Ras* MTP6 C2. La taille de ce produit de PCR correspond exactement à la taille du gène M, obtenu à partir d'un extrait d'ARN de cellules infectées par le VSV (C⁺MT1026 et C⁺MTP6), soit environ 800 nucléotides. Afin de



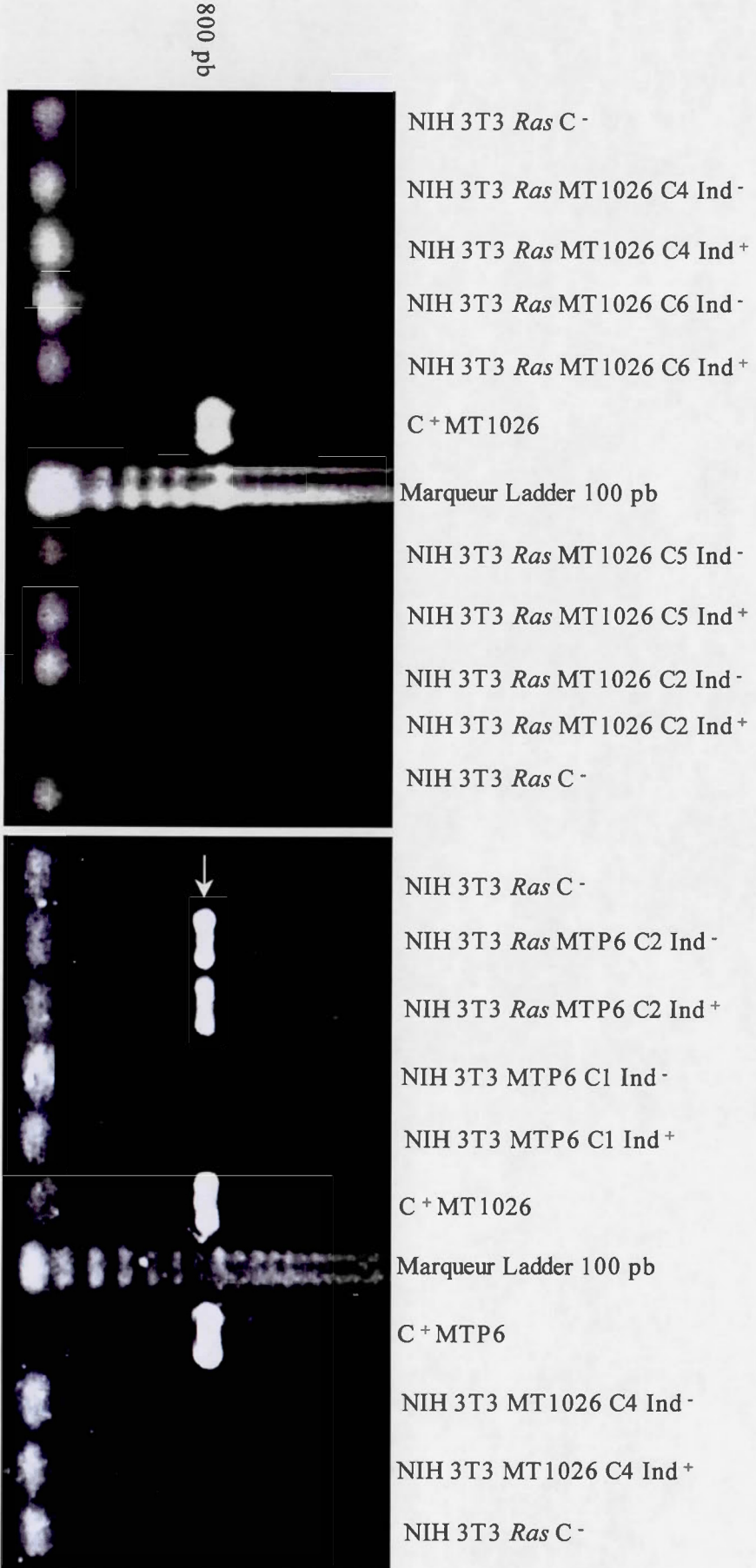


Figure 16. RT-PCR avec l'ARNm de la protéine M du VSV. Les extraits d'ARNm totaux ont été réalisés sur différents clones des lignées cellulaires stables de type NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras* ayant été transfectées avec les vecteurs pL₆N₂-R_H3SH/ZF2-PL-MTP6 et pL₆N₂-R_H3SH/ZF2-PL-MT1026. Les clones ont été induits avec 100nM de AP21967 et les cellules ont été récoltées 24 heures post-induction. Les puits indiqués C⁺ MT1026 et C⁺ MTP6 représentent des extraits d'ARN totaux de cellules infectées traitées de façon identique.

s'assurer que cet amplicon correspondait bien au gène M, celui-ci a été récupéré, puis séquencé. Les résultats obtenus montrent une identité de séquence correspondant à l'ARN génomique de la protéine de la matrice du Virus de la stomatite vésiculaire, sérotype Indiana, virus ayant été utilisé afin d'obtenir le gène M. Ainsi, bien que la protéine M ne soit pas détectable par immunobuvardage, il semble qu'il est possible de détecter le transcrit d'ARN_m par RT-PCR, du moins chez le clone NIH 3T3 Ras MTP6 C2. La raison de l'absence de détection d'un ARN_m dans les autres clones reste à déterminer, à savoir il se pourrait que ce soit une absence d'induction ou une absence d'intégration du gène M. Un autre point intéressant ressort de la Figure 16, soit le fait qu'il y ait présence d'un transcrit d'ARN_m du gène M chez le clone NIH 3T3 Ras MTP6 C2, et ce malgré la présence ou l'absence de l'inducteur AP21967. Ce phénomène vient en quelque sorte confirmer qu'il semble bien y avoir une expression constitutive de M en absence de l'inducteur, comme il avait été envisagé lors de l'analyse des résultats des essais de viabilité.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Un des principaux objectifs de ce travail était de vérifier si la protéine M du VSV peut être exprimée de manière inductible dans un vecteur de type viral, afin de reproduire les effets cytopathiques menant à l'apoptose observés lors d'une infection par le VSV entier. Un second objectif était de vérifier si ces effets cytopathiques, engendrés par l'expression de la protéine M, peuvent être utilisés afin de provoquer l'apoptose chez des cellules transformées au même titre ou davantage que chez des cellules saines.

Les cellules qui ont été utilisées afin de mener les expériences sont les lignées HeLa et L-929, chez lesquelles les effets du VSV ont été démontrés (Kopecky *et al.*, 2001 ; Centrella et Lucas-Lenard, 1982), et les lignées NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras*, un type cellulaire murin analogue aux cellules L-929 utilisé lors des infections et nécessaire afin de comparer les effets sur des cellules saines et transformées. Ainsi, trois méthodes ont été utilisées afin de parvenir à atteindre les objectifs énumérés ci-haut. D'abord, la transfection transitoire du vecteur inductible contenant le gène M, ensuite l'établissement de lignées cellulaires stables exprimant M sous contrôle inductible et finalement l'infection de cellules avec un vecteur rétroviral exprimant M, toujours sous le contrôle d'un promoteur inductible.

Certains résultats obtenus confirment que la protéine M peut être exprimée sous le contrôle d'un promoteur inductible et éventuellement altérer la viabilité cellulaire lorsque induite. Cependant, la détection efficace de la protéine M après induction reste un obstacle à surmonter. Il a été possible de détecter la protéine M en immunofluorescence indirecte lors de la transfection transitoire du vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 (Figure 4), mais en raison de la faible efficacité de transfection, peu de cellules ont été marquées à la PE et détectées. Celles ayant été détectées montraient néanmoins des caractéristiques morphologiques correspondant à certains effets cytopathiques provoqués par l'expression de la protéine M dans un contexte d'infection, tel l'arrondissement cellulaire (Blondel *et al.*, 1990). Quelques

conclusions peuvent être tirées des résultats obtenus concernant la viabilité des cellules HeLa et L-929 à la suite des transfections effectuées et de l'induction de l'expression de la protéine M (Figure 6). Il semble qu'une faible sous-population des cellules L-929 présente un contenu en ADN pouvant être associé à des cellules en apoptose, alors que les cellules HeLa ne montrent pas de signes apparents de présence d'apoptose. Ces résultats peuvent être expliqués par raisonnement logique. Il a été démontré que l'efficacité de transfection du vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL est faible sur les types cellulaires HeLa et L-929, utilisés pour les tests de viabilité. Une efficacité d'environ 5 à 10 % seulement a été observée avec le vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-EGFP (Figure 3). En admettant que la transfection du vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 a été réussie sur 5 à 10% des cellules et que l'expression de la protéine M a provoqué l'apoptose chez les cellules transfectées, cela a permis aux cellules non transfectées de maintenir leur prolifération, ce qui a mené à une très faible sous-population de cellules montrant un contenu en ADN partiellement fragmenté 48 heures post-induction. La co-transfection des vecteurs pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 et pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-EGFP (Figure 5) appuie cette hypothèse, puisque les cellules transfectées exprimant à la fois EGFP, servant de gène rapporteur, et M montrent une morphologie arrondie à 48 heures post-induction, tout comme celles ayant été détectées en immunofluorescence. Il est reconnu que l'arrondissement cellulaire fait partie de la série des éléments menant à la mort cellulaire par apoptose (Burlacu, 2003) et les deux événements ont été reliés particulièrement lors de l'infection par le VSV (Kopecky et Lyles, 2003). Ceci implique que si des cellules sont arrondies à 48 heures post-induction, il est possible que certaines cellules exprimant M se soient décollées et que celles-ci n'aient pas été prises en compte lors du test de viabilité. Ce raisonnement expliquerait les résultats de viabilité obtenus chez les lignées HeLa et L-929 à 48 heures post-induction. La transfection transitoire du vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 a néanmoins permis de détecter l'expression de la protéine M par immunofluorescence indirecte, en plus d'y associer des changements dans la morphologie des cellules transfectées, soit l'arrondissement cellulaire, un phénomène faisant partie du processus de l'apoptose et une caractéristique de l'expression de la protéine M lors d'une infection virale par le VSV (Kopecky et Lyles, 2003). Toutefois, la faible efficacité de transfection du vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL n'a pas permis de réaliser des essais de viabilité fiables sur les cellules transfectées, possiblement en raison de l'effet délétère de

l'expression de la protéine M, qui semble supprimer les cellules transfectées et favoriser la croissance des cellules non transfectées, ce qui engendre un résultat final biaisé par rapport à la réalité. La faible efficacité de transfection a représenté un problème important pour les essais de transfection transitoire, et ce malgré l'utilisation d'un ADN très pur et une optimisation des conditions de la transfection.

La méthode d'électroporation a été utilisée afin d'introduire les vecteurs pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 (M sauvage) et pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MT1026 (M mutante) respectivement dans les lignées cellulaires NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras*. La lignée HeLa a été électroporée avec le vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 uniquement. Cette technique a permis d'obtenir une efficacité de transfert des vecteurs nettement supérieure à la transfection transitoire, ce qui a généré une quantité élevée de clones stables qui ont ensuite été isolés. En ce qui concerne les résultats de viabilité obtenus chez les lignées cellulaires stables, en plus des changements morphologiques et d'une perte d'adhérence marquée des cellules, une nette diminution de la viabilité a été constatée chez certains clones HeLa et NIH 3T3, alors que ces changements ont été observés dans une très moindre mesure chez les clones NIH 3T3 *Ras*. Ces effets cytopathiques ont été évalués à 48 heures post-induction de l'expression de la protéine M chez les clones HeLa et à 4 heures et 12 heures post-induction chez les clones NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras*. Cette différence temporelle dans les essais de viabilité entre les clones HeLa, NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras* s'est avérée nécessaire en raison d'une perte d'adhérence des clones NIH 3T3 tôt post-induction, qui compliquait les essais de coloration au Trypan.

La protéine M ayant été détectée en immunofluorescence indirecte lors des essais de transfection transitoire, il a été pris pour acquis que celle-ci devrait être exprimée également chez les lignées cellulaires stables. Parmi les clones stables HeLa ayant été électroporés avec le vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6, trois ont montré une augmentation de la mortalité en fonction de l'augmentation de la concentration en inducteur (Figure 7). Les deux autres clones ont montré une réponse à l'inducteur très variable d'une concentration à une autre. Il semble que tous les clones ne soient pas aussi sensibles à l'inducteur, ce qui est appuyé par le fournisseur du vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL (ARIAD Pharmaceuticals Inc., 2002). Les

résultats de viabilité de la population de clones vont également en ce sens, puisqu'ils montrent des valeurs variables entre les concentrations d'inducteur utilisées, en plus d'une tendance légèrement dose-dépendante. Sachant que l'expression de la protéine M provoque des effets cytopathiques menant à l'apoptose et que l'inducteur du système d'expression ne provoque aucun effet délétère sur les cellules, il est possible de faire un lien entre l'accroissement de la mortalité des clones et une augmentation de l'expression de la protéine M en fonction de la concentration d'inducteur utilisée. En admettant cette hypothèse, les clones HeLa, chez qui une augmentation de mortalité en fonction de la concentration d'inducteur a été observée, seraient en fait des clones exprimant la protéine M de manière dose-dépendante. Cette expression mènerait ainsi à une mortalité dose-dépendante en fonction de l'expression de la protéine M, bien que la protéine n'ait pas été détectée clairement et que l'ARN_m ait été détecté chez un clone. Il est néanmoins possible d'observer une mortalité basale d'environ 10 à 15% chez tous les clones HeLa, ce qui est nettement plus élevé que chez le témoin contrôle. Bien que le système d'expression inductible utilisé soit le plus silencieux des systèmes disponibles (Clackson, 2000 ; Senner et al., 2001 ; Xu et al., 2003) à ce jour, il est possible qu'une production basale de la protéine M soit à l'origine de cette mortalité en absence d'inducteur.

Sachant que l'infection par le VSV portant une mutation au niveau du 51^{ème} acide aminé (M₅₁R) de la protéine M (MT1026) provoque l'apoptose plus lentement que son homologue sauvage (MTP6) chez certains types cellulaires lors d'une infection (Kopecky et Lyles, 2003), les deux formes de la protéine ont été utilisées afin de vérifier s'il en était de même lorsque la protéine est exprimée en absence des autres protéines virales. Les clones stables dérivés des lignées cellulaires NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras*, ayant été respectivement électroporées avec les vecteurs pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 et pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MT1026, ont été utilisés pour réaliser des tests de viabilité. Les essais de viabilité ont d'abord été effectués à 24 heures et 48 heures post-induction de l'expression de la protéine M (Résultats non présentés). Toutefois, ces intervalles temporels ont été révisés à la baisse en raison d'une forte perte d'adhérence des cellules et de l'apparition de changements morphologiques majeurs tôt après l'induction. Ainsi, les études de viabilité ont plutôt été effectuées à 4 heures et 12 heures post-induction, ce qui a permis d'obtenir des données plus

représentatives. D'abord, des changements morphologiques importants sont survenus chez plusieurs des clones étudiés après l'induction de l'expression de la protéine M avec diverses concentrations d'inducteur, notamment à 12 heures post-induction (Figures 8 à 12). En ce qui concerne l'évaluation de la viabilité des clones stables de la lignée NIH 3T3, l'augmentation de mortalité entre 4 heures et 12 heures post-induction M est remarquable (Figure 13). À 12 heures post-induction, presque tous les clones présentent plus de 75% de mortalité avec une concentration d'inducteur de 500 nM. Trois des quatre clones NIH 3T3 testés semblent présenter une mortalité relativement dépendante de la concentration d'inducteur utilisée à 12 heures post-induction. Ce phénomène n'est cependant pas observable à 4 heures post-induction. Il est fort possible que 4 heures post-induction soit trop tôt pour voir un effet dose-dépendant dans l'induction. Comme il a été constaté chez les clones HeLa, il y a également présence de mortalité chez les clones NIH 3T3 n'ayant pas été exposés à l'inducteur, et celle-ci augmente dans le temps. Cette mortalité pourrait par conséquent être imputable à une expression basale de la protéine M ayant pour effet de provoquer l'apoptose en absence d'inducteur. Contrairement à nos attentes, la mutation M51R au niveau de la protéine MT1026 ne semble pas influencer la mortalité cellulaire, puisque les deux clones exprimant celle-ci montrent des résultats de mortalité équivalents aux clones exprimant la protéine MTP6 ne portant pas de mutation. Concernant l'évaluation de la viabilité des clones NIH 3T3 *Ras*, la différence entre 4 heures et 12 heures post-induction de l'expression de la protéine M (Figure 14) est nettement moins remarquable que celle ayant été observée chez les clones NIH 3T3. À 12 heures post-induction et avec une concentration d'inducteur maximale équivalente à celle utilisée avec les clones NIH 3T3, soit 500 nM, deux des quatre clones NIH 3T3 *Ras* seulement affichent une mortalité supérieure à 20% mais ne dépassant pas 25%, alors que trois-quarts des clones NIH 3T3 affichaient une mortalité de plus de 75% avec cette concentration d'inducteur. Trois des clones semblent afficher une augmentation de la mortalité en fonction de la concentration de l'inducteur à 12 heures post-induction. Encore une fois, il est possible de remarquer la présence de mortalité en absence d'inducteur. La mutation M₅₁R de la protéine MT1026 ne semble pas avoir d'incidence sur la mortalité des clones NIH 3T3 *Ras*, tout comme il a été observé chez les clones NIH 3T3. À nouveau, la mortalité des clones NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras* ne semble pas attribuable à la présence ou à un effet nocif de la concentration en inducteur, puisque les cellules témoins présentent une

mortalité de 3 à 5% seulement, malgré la présence de celui-ci à une concentration équivalente. Prenant en considération que la protéine M a été exprimée et détectée par immunofluorescence indirecte lors des transfections transitoires et qu'elle devrait l'être aussi chez les clones stables, et sachant que celle-ci provoque des effets cytopathiques menant à la mort cellulaire par apoptose, un lien peut être établi entre la mortalité observée chez les clones NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras* et l'expression de la protéine M du VSV. Deux méthodes légèrement différentes ont été utilisées afin d'évaluer la viabilité cellulaire, soit la coloration au bleu de Trypan et compte cellulaire visuel pour les clones NIH 3T3 et la coloration au PI et compte cellulaire par FACS pour les clones NIH 3T3 *Ras*. L'obtention de résultats très divergents au niveau de la viabilité des clones NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras* (Figures 13 et 14), a soulevé la question à savoir si la méthode utilisée n'était pas en partie responsable de ces résultats. Après une évaluation approfondie des résultats et une comparaison des deux méthodes de détection dans la littérature, les résultats de viabilité obtenus pour les clones NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras* ne peuvent pas être dus à la divergence des deux méthodes utilisées. D'abord, parce que ces deux méthodes reposent sur un principe qui est le même, c'est-à-dire une mesure de l'activité des pompes des membranes cellulaires permettant d'évacuer une molécule colorante. La viabilité des cellules peut ainsi être évaluée, puisque une cellule colorée correspond à une cellule dont les pompes cellulaires sont inefficaces, d'où la non viabilité. Il a été démontré que la coloration au bleu de Trypan sous-estime d'environ 20% la proportion de cellules non viables par comparaison à la coloration avec un agent fluorescent comme le PI, qui est nettement plus sensible et stable à la détection (Altman *et al.*, 1993). La différence observée entre la mortalité des clones NIH 3T3 (évaluée au bleu de Trypan) et NIH 3T3 *Ras* (évaluée au PI) devrait en fait être plus élevée encore que ce qui a été obtenu. Quant à la différence temporelle ayant été constatée dans l'apparition des effets cytopathiques chez les clones HeLa par rapport aux clones NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras*, celle-ci pourrait être expliquée par le fait que les lignées cellulaires ne répondent pas toutes de la même façon à une infection au VSV (Kopecky et Lyles, 2003), et qu'il est ainsi plausible que les effets engendrés par l'expression de la protéine M se présentent différemment dans le temps en fonction de la lignée cellulaire utilisée.

Malgré l'observation de changements morphologiques et la diminution de la viabilité des cellules en fonction de l'expression de la protéine M chez plusieurs clones NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras*, il a été impossible de détecter la protéine M par immunobuvardage sur des extraits protéiques totaux, et ce nonobstant l'utilisation d'un anticorps polyclonal anti-VSV (dirigé contre toutes les protéines virales) et d'un anticorps monoclonal anti-M (Figure 15). Pourtant, avec le même anticorps polyclonal anti-VSV, il a été possible de détecter M en immunofluorescence indirecte lors des transfections transitoires. Comme il a été mentionné plus tôt, la détection efficace de la protéine M reste un obstacle majeur à résoudre lors de l'utilisation de systèmes d'expression. Malgré la présence de changements morphologiques cellulaires, Blondel et al. (1990) sont restés dans l'incapacité de détecter la protéine M en immunofluorescence. Des problèmes de détection en immunobuvardage ont été rencontrés par d'autres, ayant aussi utilisé des systèmes d'expression de la protéine M (Black *et al.*, 1994 ; Hetzel, 1996 ; Despars, 2002). Partant du point de vue que M ne peut être détectée par immunobuvardage, une analyse des ARN_m de M a également été effectuée. La détection de l'ARN_m du gène M a été possible chez un seul des clones cellulaires stables provenant de la lignée NIH 3T3 *Ras*. Ceci indique qu'un ARN_m est transcrit chez ce clone, mais que la protéine ne peut cependant pas être détectée par immunobuvardage. Ces problèmes peuvent en grande partie être expliqués par plusieurs facteurs qui sont inter-reliés. D'abord, il est bien connu que la protéine M a la capacité d'inhiber la transcription de gènes étant sous le contrôle de promoteurs viraux (Blondel *et al.*, 1990 ; Black et Lyles, 1992 ; Paik *et al.*, 1995 ; Lyles *et al.*, 1996), mais aussi sous le contrôle de promoteurs cellulaires (Lyles *et al.*, 1996 ; Ferran et Lucas-Lenard, 1997 ; Amhed et Lyles, 1998 ; Kopecky et Lyles, 2003). En effet, la protéine M inhibe la transcription amorcée par les ARN polymérases I, II et III, et ce même en absence des autres protéines virales (Amhed et Lyles, 1998). Le promoteur inductible du système d'expression employé lors de cette étude est le promoteur cellulaire minimal de l'IL-2. Une quantité infime de la protéine M, non détectable par immunobuvardage, pourrait donc être à l'origine d'une rétro-inhibition de la transcription de M elle-même. Cette hypothèse tient la route, sachant qu'il a été rapporté que la quantité nécessaire de protéine M pour inhiber la transcription des gènes cellulaires correspond à moins de 1% de la quantité de protéine M produite durant les six premières heures d'une infection par le VSV (Black *et al.*, 1994). Il est aussi connu que l'inhibition de la transcription par la protéine M est reliée à sa

capacité d'inhiber le transport nucléocytoplasmique (von Kobbe *et al.*, 2000) des ARN et des protéines via une interaction avec la nucléoporine Nup98 (Her *et al.*, 1997 ; Gustin, 2003). La protéine M pourrait dès lors inhiber le transport de son propre ARN_m produit à partir de systèmes d'expression utilisant la machinerie cellulaire de la cellule hôte comme dans le cas présent, ce qui n'est cependant pas le cas dans un contexte d'infection virale où les ARN_m et les protéines virales sont synthétisés dans le cytoplasme. Ainsi, par cette boucle de rétro-inhibition, une quantité minime de la protéine M serait produite, mais pourrait tout de même être à l'origine des changements morphologiques observés et de la diminution de la viabilité des clones HeLa, NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras*, sans pour autant que la protéine ne soit détectable.

Il faut cependant préciser ici que les extraits protéiques et d'ARN, utilisés lors des essais d'immunobuvardage et de RT-PCR, ne proviennent pas des clones utilisées pour effectuer les essais de viabilité, à l'exception du clone NIH 3T3 *Ras* MT1026 C2, et que ceux-ci sont des clones chez lesquels les essais de viabilité n'ont pas montré de relation entre la mortalité et la présence de l'inducteur. Lors des tests de viabilité, le clone NIH 3T3 *Ras* MT1026 C2 montrait une augmentation de la mortalité en fonction de l'accroissement de la concentration en inducteur, mais aussi une augmentation de la mortalité dans le temps. Toutefois, il a été impossible de détecter la protéine M, ni l'ARN_m chez ce clone. Les autres clones utilisés pour effectuer les tests de viabilité n'ont pas pu être maintenus en culture assez longtemps pour réaliser les expériences d'immunobuvardage et de RT-PCR. Il est possible de penser que la détection de la protéine ou de l'ARN_m de M aurait pu être détecté chez certains des clones utilisées lors des essais de viabilité.

La différence entre la mortalité des clones NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras*, pourrait être attribuable à la transformation de l'oncogène *Ras* de cette dernière lignée cellulaire. Il est reconnu que la protéine M du VSV, en présence et en absence des autres protéines virales, a la capacité d'inhiber la transcription cellulaire et que cette activité a pour conséquence d'induire l'apoptose via la voie mitochondriale par l'activation de la caspase 9 et de la caspase 3 (Kopecky *et al.*, 2001 ; Kopecky et Lyles, 2003 ; Gaddy et Lyles, 2005). Il semble que la transformation de l'oncogène *Ras* puisse inhiber, en partie, les effets cytopathiques

engendrés par l'expression de la protéine M. La protéine *Ras* est une protéine G membranaire servant d'interrupteur moléculaire en transmettant les signaux provenant de la membrane cellulaire au noyau. Ces signaux biochimiques mènent à la synthèse protéique et la survie des cellules, la prolifération et la différenciation. La famille des protéines *Ras* compte plusieurs membres (H, K, M, N et R) et chacun des membres consiste en une séquence de 190 résidus d'acides aminés dont les séquences en N et C-terminal sont très conservées (Barradas *et al.*, 1999). L'apoptose et la progression dans le cycle cellulaire sont des processus hautement régulés et inter-reliés, qui assurent la fidélité génétique durant la prolifération des cellules. Parmi les effecteurs de la voie de signalisation dépendant de la protéine *Ras*, les mieux connus sont Raf-1, Rac, Rho et PI3-K. Ce dernier joue un rôle important dans la réponse anti-apoptotique, via l'activation de la protéine kinase Akt, qui a la capacité de réguler à la baisse l'expression des protéines pro-apoptotiques Bad et caspase 9 (Jarpe *et al.*, 1998 ; Adjei, 2001), et de moduler à la hausse d'autres protéines kinases impliquées dans la progression du cycle cellulaire. La transformation de *Ras* permet aussi d'inhiber l'apoptose induite par p53 en modulant à la hausse l'expression de NF- κ B, qui est, dans ce contexte, un facteur de transcription pro-survie. Ainsi, la transformation oncogénique de *Ras* favorise la survie des cellules transformées non seulement par modulation à la hausse de l'expression des protéines anti-apoptotiques, mais en modulant aussi à la baisse les protéines pro-apoptotiques. Cette modulation à la baisse des protéines pro-apoptotiques semble limiter les effets engendrés par l'expression de la protéine M du VSV, comme il est possible de le constater chez les essais de viabilité des clones NIH 3T3 *Ras*. Les lignées cellulaires transformées ayant un oncogène *Ras* activé, seraient donc moins sensibles aux effets cytopathiques provoqués par M, que d'autres lignées transformées, en raison des voies de signalisation impliquées dans l'activation de *Ras*.

Pour terminer, il aurait été intéressant de pouvoir vérifier si les virus/vecteurs, produits avec la lignée d'encapsidation Phœnix écotropique, ont la même capacité que certains clones stables exprimant la protéine M du VSV à provoquer les effets cytopathiques associés à l'expression de cette dernière. Cependant, il a été impossible de titrer les virus, et ce malgré l'utilisation de diverses méthodes. Il est possible que l'incapacité de titrer les virus/vecteurs pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 et pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MT1026 soit

simplement due à l'expression basale de la protéine M en absence de l'inducteur. Il a été constaté, lors des essais de viabilité chez les clones stables, que effectivement il semblait y avoir une expression basale de la protéine M en absence de l'inducteur du système d'expression. Advenant l'expression de M lors de la production de virus, il est concevable qu'une partie des cellules productrices de virus soient mortes. Partant avec l'idée que les titres viraux obtenus avec le vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL se situent aux alentours de 10³ particules virales/ml (ARIAD, 2002), ce titre peut avoir chuté en raison de la perte de plusieurs cellules productrices de virus. De plus, un autre facteur peut s'ajouter à ce phénomène, c'est-à-dire que pour titrer les virus, une infection doit être réalisée et il faut sélectionner les cellules résistantes à la G418, ayant formé un foyer d'infection, afin de déterminer le titre viral. Toutefois, la sélection à la G418 nécessite plusieurs jours, ce qui laisse supposer, encore une fois, que l'expression basale de la protéine M peut avoir mené à la mort de nombreux foyers d'infection. Ces deux facteurs réunis, soit la perte de cellules productrices de virus et la mort de foyers d'infection, mènent probablement à l'obtention de titres viraux inférieurs à 10³, ce qui rend la titration particulièrement difficile. Dans le but de tenter de contourner ce problème, une concentration des surnageants viraux de l'ordre de 200 fois a été tentée, mais n'a néanmoins pas permis de déterminer le titre viral des virus/vecteurs pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 et pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MT1026. Il est également possible que la lignée cellulaire Phœnix écotropique soit très sensible aux effets provoqués par la protéine M, au même titre que cela semblait être le cas pour certains clones stables de la lignée NIH 3T3. Peut-être que l'utilisation d'une lignée cellulaire d'encapsidation moins sensible pourrait générer des titres viraux plus appréciables.

Le développement d'une lignée cellulaire modifiée, plus résistante à l'apoptose et ayant la capacité de produire des particules virales non répliquatives, pourrait éventuellement permettre la production de vecteurs exprimant la protéine M du VSV. Évidemment, ce genre de développement nécessite du temps et peut-être sera-t-il envisagé dans un avenir proche. Une autre approche pourrait également être utilisée afin de réduire les effets délétères de la protéine M sur la lignée d'encapsidation, l'utilisation de siRNA lors de la production de virus pourrait empêcher la traduction de l'ARN_m de M et ainsi inhiber son effet cytopathique.

CONCLUSION

L'expression de la protéine M sous le contrôle d'un promoteur inductible a été réalisée selon trois méthodes différentes ; la transfection transitoire, l'établissement de lignées cellulaires stables et l'infection avec un vecteur de type rétroviral. Le but de l'expression de la protéine M dans ces systèmes était de reproduire les effets cytopathiques engendrés par l'expression de cette protéine dans le contexte d'une infection virale, c'est-à-dire induire l'apoptose. Les résultats obtenus suggèrent que la transfection transitoire du vecteur pL₆N₂-R_HS3H/ZF2-PL-MTP6 permet la détection de la protéine M en immunofluorescence, mais la faible efficacité de transfection ne permet pas de réaliser des essais de détection d'apoptose sur les cellules transfectées. La création de lignées cellulaires stables, exprimant M sous le contrôle d'un promoteur inductible, a permis de réaliser des essais de viabilité cellulaire et de constater, chez certains clones, une augmentation de la mortalité des cellules en fonction de l'accroissement de la concentration en inducteur, donc de l'expression de M. L'utilisation de la protéine M mutante (MT1026) n'a pas montré de différences avec la protéine M sauvage (MTP6) dans les résultats de viabilité, contrairement à ce qui était attendu.

Un autre objectif était de vérifier si les effets cytopathiques, engendrés par l'expression de la protéine M, peuvent être utilisés afin de provoquer l'apoptose chez des cellules transformées au même titre ou davantage que chez des cellules saines. Ainsi, les lignées cellulaires NIH 3T3 et NIH 3T3 *Ras* ont été utilisées. La lignée NIH 3T3 *Ras* porte une mutation dans l'oncogène *Ras*, et la protéine Harvey-*Ras* est constitutivement active chez cette lignée. Des essais de viabilité, durant l'expression de M, ont été effectués sur des clones stables de ces lignées cellulaires et les résultats obtenus montrent une sensibilité nettement plus élevée à l'expression de la protéine M pour les clones NIH 3T3 comparativement aux clones NIH 3T3 *Ras*. La faible mortalité des cellules NIH 3T3 *Ras* pourrait être due à l'activation des voies de signalisation contrôlées par la protéine *Ras*, qui favoriserait la régulation à la hausse de protéines anti-apoptotiques et la régulation à la baisse de protéines pro-apoptotiques, ce qui pourrait contrecarrer, en partie, les effets cytopathiques engendrés

par l'expression de la protéine M. L'utilisation de la protéine M comme outil de contrôle des cellules transformées ne semble pas très efficace dans le contexte d'une transformation oncogénique de *Ras*. Il serait intéressant d'évaluer son efficacité sur d'autres lignées cellulaires transformées, chez lesquelles la transformation est survenue ailleurs que sur l'oncogène *Ras*.

REFERENCES

- Adams, J. M. and Cory, S. (2002). Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 14, 715-20.
- Aderem, A. (2002). How to eat something bigger than your head. *Cell* 110, 5-8.
- Adjei, A. A. (2001). Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 93, 1062-74.
- Ahmed, M. and Lyles, D. S. (1998). Effect of vesicular stomatitis virus matrix protein on transcription directed by host RNA polymerases I, II, and III. *J Virol* 72, 8413-9.
- Altman, S. A., Randers, L., and Rao, G. (1993). Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnol Prog* 9, 671-4.
- ARIAD. (2002). ARGENT™ Regulated Transcription Retrovirus Kit. ARIAD Pharmaceuticals, Inc.
- Arends, M. J., Morris, R. G., and Wyllie, A. H. (1990). Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 136, 593-608.
- Auricchio, A., Rivera, V. M., Clackson, T., O'Connor, E. E., Maguire, A. M., Tolentino, M. J., Bennett, J., and Wilson, J. M. (2002). Pharmacological regulation of protein expression from adeno-associated viral vectors in the eye. *Mol Ther* 6, 238-42.
- Balachandran, S., Porosnicu, M., and Barber, G. N. (2001). Oncolytic activity of vesicular stomatitis virus is effective against tumors exhibiting aberrant p53, Ras, or myc function and involves the induction of apoptosis. *J Virol* 75, 3474-9.
- Barradas, M., Monjas, A., Diaz-Meco, M. T., Serrano, M., and Moscat, J. (1999). The downregulation of the pro-apoptotic protein Par-4 is critical for Ras-induced survival and tumor progression. *EMBO J* 18, 6362-9.

- Beausoleil, S. (1994). Protéine M de mutants P- du Virus de la Stomatite Vésiculaire : modifications génétiques et effets sur la synthèse protéique. Mémoire de Maîtrise de l'Université du Québec à Montréal.
- Black, B. L., Brewer, G., and Lyles, D. S. (1994). Effect of vesicular stomatitis virus matrix protein on host-directed translation in vivo. *J Virol* 68, 555-60.
- Black, B. L. and Lyles, D. S. (1992). Vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits host cell-directed transcription of target genes in vivo. *J Virol* 66, 4058-64.
- Black, B. L., Rhodes, R. B., McKenzie, M., and Lyles, D. S. (1993). The role of vesicular stomatitis virus matrix protein in inhibition of host-directed gene expression is genetically separable from its function in virus assembly. *J Virol* 67, 4814-21.
- Blondel, D., Harmison, G. G., and Schubert, M. (1990). Role of matrix protein in cytopathogenesis of vesicular stomatitis virus. *J Virol* 64, 1716-25.
- Brown, D. G., Sun, X. M., and Cohen, G. M. (1993). Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. *J Biol Chem* 268, 3037-9.
- Burlacu, A. (2003). Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med* 7, 249-57.
- Cain, K., Bratton, S. B., and Cohen, G. M. (2002). The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* 84, 203-14.
- Centrella, M. and Lucas-Lenard, J. (1982). Regulation of protein synthesis in vesicular stomatitis virus-infected mouse L-929 cells by decreased protein synthesis initiation factor 2 activity. *J Virol* 41, 781-91.
- Chambard, J. C. and Pognonec, P. (1998). A reliable way of obtaining stable inducible clones. *Nucleic Acids Res* 26, 3443-4.
- Choi, J., Chen, J., Schreiber, S. L., and Clardy, J. (1996). Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* 273, 239-42.

Clackson, T. (1997). Controlling mammalian gene expression with small molecules. *Curr Opin Chem Biol* 1, 210-8.

Clackson, T. (2000). Regulated gene expression systems. *Gene Ther* 7, 120-5.

Corbel, S. Y. and Rossi, F. M. (2002). Latest developments and in vivo use of the Tet system: ex vivo and in vivo delivery of tetracycline-regulated genes. *Curr Opin Biotechnol* 13, 448-52.

Crittenden, M., Gough, M., Chester, J., Kottke, T., Thompson, J., Ruchatz, A., Clackson, T., Cosset, F. L., Chong, H., Diaz, R. M., Harrington, K., Alvarez Vallina, L., and Vile, R. (2003). Pharmacologically regulated production of targeted retrovirus from T cells for systemic antitumor gene therapy. *Cancer Res* 63, 3173-80.

Danial, N. N. and Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-19.

Desforges, M., Charron, J., Berard, S., Beausoleil, S., Stojdl, D. F., Despars, G., Laverdiere, B., Bell, J. C., Talbot, P. J., Stanners, C. P., and Poliquin, L. (2001). Different host-cell shutoff strategies related to the matrix protein lead to persistence of vesicular stomatitis virus mutants on fibroblast cells. *Virus Res* 76, 87-102.

Desforges, M., Despars, G., Berard, S., Gosselin, M., McKenzie, M. O., Lyles, D. S., Talbot, P. J., and Poliquin, L. (2002). Matrix protein mutations contribute to inefficient induction of apoptosis leading to persistent infection of human neural cells by vesicular stomatitis virus. *Virology* 295, 63-73.

Despars, G. (2002). Rôle de la protéine de la Matrice dans l'arrondissement et l'induction de l'apoptose par le Virus de la Stomatite Vésiculaire. Mémoire de Maîtrise de l'Université du Québec à Montréal.

Dobbelstein, M. (2003). Viruses in therapy--royal road or dead end? *Virus Res* 92, 219-21.

Fernandez, M., Porosnicu, M., Markovic, D., and Barber, G. N. (2002). Genetically engineered vesicular stomatitis virus in gene therapy: application for treatment of malignant disease. *J Virol* 76, 895-904.

- Ferran, M. C. and Lucas-Lenard, J. M. (1997). The vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits transcription from the human beta interferon promoter. *J Virol* 71, 371-7.
- Francoeur, A. M., Poliquin, L., and Stanners, C. P. (1987). The isolation of interferon-inducing mutants of vesicular stomatitis virus with altered viral P function for the inhibition of total protein synthesis. *Virology* 160, 236-45.
- Gadaleta, P., Vacotto, M., and Coulombie, F. (2002). Vesicular stomatitis virus induces apoptosis at early stages in the viral cycle and does not depend on virus replication. *Virus Res* 86, 87-92.
- Gaddy, D. F. and Lyles, D. S. (2005). Vesicular stomatitis viruses expressing wild-type or mutant M proteins activate apoptosis through distinct pathways. *J Virol* 79, 4170-9.
- Goedegebuure, P. S. and Eberlein, T. J. (1997). Vaccine Trials for the Clinician: Prospects for Viral and Non-Viral Vectors. *Oncologist* 2, 300-310.
- Gould, D. J., Berenstein, M., Dreja, H., Ledda, F., Podhajcer, O. L., and Chernajovsky, Y. (2000). A novel doxycycline inducible autoregulatory plasmid which displays "on"/"off" regulation suited to gene therapy applications. *Gene Ther* 7, 2061-70.
- Gustin, K. E. (2003). Inhibition of nucleo-cytoplasmic trafficking by RNA viruses: targeting the nuclear pore complex. *Virus Res* 95, 35-44.
- Her, L. S., Lund, E., and Dahlberg, J. E. (1997). Inhibition of Ran guanosine triphosphatase-dependent nuclear transport by the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *Science* 276, 1845-8.
- Hetzel, B. (1996). Construction d'un vecteur d'expression eucaryote inductible pour l'étude de la protéine cytotoxique de la Matrice du Virus de la Stomatite Vésiculaire. Mémoire de Maîtrise de l'Université du Québec à Montréal.
- Hinzman, E. E., Barr, J. N., and Wertz, G. W. (2002). Identification of an upstream sequence element required for vesicular stomatitis virus mRNA transcription. *J Virol* 76, 7632-41.

Ho, S. N., Biggar, S. R., Spencer, D. M., Schreiber, S. L., and Crabtree, G. R. (1996). Dimeric ligands define a role for transcriptional activation domains in reinitiation. *Nature* 382, 822-6.

Hoffmann, P. R., deCathelineau, A. M., Ogden, C. A., Leverrier, Y., Bratton, D. L., Daleke, D. L., Ridley, A. J., Fadok, V. A., and Henson, P. M. (2001). Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J Cell Biol* 155, 649-59.

Hollon, T. (2000). Gene therapy--a loss of innocence. *Nat Med* 6, 1.

Holm, P. S., Lage, H., Bergmann, S., Jurchott, K., Glockzin, G., Bernshausen, A., Mantwill, K., Ladhoff, A., Wichert, A., Mymryk, J. S., Ritter, T., Dietel, M., Gansbacher, B., and Royer, H. D. (2004). Multidrug-resistant cancer cells facilitate E1-independent adenoviral replication: impact for cancer gene therapy. *Cancer Res* 64, 322-8.

Hu, W. S. and Pathak, V. K. (2000). Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy. *Pharmacol Rev* 52, 493-511.

Jarpe, M. B., Widmann, C., Knall, C., Schlesinger, T. K., Gibson, S., Yujiri, T., Fanger, G. R., Gelfand, E. W., and Johnson, G. L. (1998). Anti-apoptotic versus pro-apoptotic signal transduction: checkpoints and stop signs along the road to death. *Oncogene* 17, 1475-82.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-57.

Kootstra, N. A. and Verma, I. M. (2003). Gene therapy with viral vectors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43, 413-39.

Kopecky, S. A. and Lyles, D. S. (2003). The cell-rounding activity of the vesicular stomatitis virus matrix protein is due to the induction of cell death. *J Virol* 77, 5524-8.

Kopecky, S. A. and Lyles, D. S. (2003). Contrasting effects of matrix protein on apoptosis in HeLa and BHK cells infected with vesicular stomatitis virus are due to inhibition of host gene expression. *J Virol* 77, 4658-69.

Kopecky, S. A., Willingham, M. C., and Lyles, D. S. (2001). Matrix protein and another viral component contribute to induction of apoptosis in cells infected with vesicular stomatitis virus. *J Virol* 75, 12169-81.

Letchworth, G. J., Rodriguez, L. L., and Del carrera, J. (1999). Vesicular stomatitis. *Vet J* 157, 239-60.

Li, P., Nijhawan, D., and Wang, X. (2004). Mitochondrial activation of apoptosis. *Cell* 116, S57-9, 2 p following S59.

Lundstrom, K. (2003). Latest development in viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol* 21, 117-22.

Lyles, D. S. and McKenzie, M. O. (1997). Activity of vesicular stomatitis virus M protein mutants in cell rounding is correlated with the ability to inhibit host gene expression and is not correlated with virus assembly function. *Virology* 229, 77-89.

Lyles, D. S., McKenzie, M. O., Ahmed, M., and Woolwine, S. C. (1996). Potency of wild-type and temperature-sensitive vesicular stomatitis virus matrix protein in the inhibition of host-directed gene expression. *Virology* 225, 172-80.

Melki, R., Gaudin, Y., and Blondel, D. (1994). Interaction between tubulin and the viral matrix protein of vesicular stomatitis virus: possible implications in the viral cytopathic effect. *Virology* 202, 339-47.

Mullen, J. T. and Tanabe, K. K. (2002). Viral oncolysis. *Oncologist* 7, 106-19.

Nettelbeck, D. M. (2003). Virotherapeutics: conditionally replicative adenoviruses for viral oncolysis. *Anticancer Drugs* 14, 577-84.

Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., and Hofschneider, P. H. (1982). Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1, 841-5.

Niidome, T. and Huang, L. (2002). Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther* 9, 1647-52.

Nishikawa, M. and Huang, L. (2001). Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther* 12, 861-70.

Obuchi, M., Fernandez, M., and Barber, G. N. (2003). Development of recombinant vesicular stomatitis viruses that exploit defects in host defense to augment specific oncolytic activity. *J Virol* 77, 8843-56.

Paik, S. Y., Banerjee, A. C., Harmison, G. G., Chen, C. J., and Schubert, M. (1995). Inducible and conditional inhibition of human immunodeficiency virus proviral expression by vesicular stomatitis virus matrix protein. *J Virol* 69, 3529-37.

Petersen, J. M., Her, L. S., Varvel, V., Lund, E., and Dahlberg, J. E. (2000). The matrix protein of vesicular stomatitis virus inhibits nucleocytoplasmic transport when it is in the nucleus and associated with nuclear pore complexes. *Mol Cell Biol* 20, 8590-601.

Pollock, R. and Clackson, T. (2002). Dimerizer-regulated gene expression. *Curr Opin Biotechnol* 13, 459-67.

Pollock, R., Giel, M., Linher, K., and Clackson, T. (2002). Regulation of endogenous gene expression with a small-molecule dimerizer. *Nat Biotechnol* 20, 729-33.

Pollock, R., Issner, R., Zoller, K., Natesan, S., Rivera, V. M., and Clackson, T. (2000). Delivery of a stringent dimerizer-regulated gene expression system in a single retroviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13221-6.

Porter, A. G. (1999). Protein translocation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 9, 394-401.

Ravichandran, K. S. (2003). "Recruitment signals" from apoptotic cells: invitation to a quiet meal. *Cell* 113, 817-20.

Rivera, V. M., Clackson, T., Natesan, S., Pollock, R., Amara, J. F., Keenan, T., Magari, S. R., Phillips, T., Courage, N. L., Cerasoli, F. Jr, Holt, D. A., and Gilman, M. (1996). A humanized system for pharmacologic control of gene expression. *Nat Med* 2, 1028-32.

Robbins, P. D. and Ghivizzani, S. C. (1998). Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol Ther* 80, 35-47.

Rochlitz, C. F. (2001). Gene therapy of cancer. *Swiss Med Wkly* 131, 4-9.

Romano, G., Pacilio, C., and Giordano, A. (1998). Gene Transfer Technology in Therapy: Current Applications and Future Goals. *Oncologist* 3, 225-236.

Rose, J. K. and Gallione, C. J. (1981). Nucleotide sequences of the mRNA's encoding the vesicular stomatitis virus G and M proteins determined from cDNA clones containing the complete coding regions. *J Virol* 39, 519-28.

Santé Canada. (2004). Rapport d'étape sur la lutte contre le cancer au Canada. Santé Canada.

Senner, V., Sotoodeh, A., and Paulus, W. (2001). Regulated gene expression in glioma cells: a comparison of three inducible systems. *Neurochem Res* 26, 521-4.

Shi, Y. (2002). Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure* 10, 285-8.

Société Canadienne du Cancer. (2003). La chimiothérapie vous et votre traitement. Société canadienne du cancer.

Société Canadienne du Cancer. (2003). La radiothérapie vous et votre traitement. Société canadienne du cancer.

Société canadienne du cancer / Institut national du cancer du Canada. (2005). Statistiques canadiennes sur le cancer 2005. Santé Canada.

Spencer, D. M., Wandless, T. J., Schreiber, S. L., and Crabtree, G. R. (1993). Controlling signal transduction with synthetic ligands. *Science* 262, 1019-24.

Stillman, E. A. and Whitt, M. A. (1997). Mutational analyses of the intergenic dinucleotide and the transcriptional start sequence of vesicular stomatitis virus (VSV) define sequences required for efficient termination and initiation of VSV transcripts. *J Virol* 71, 2127-37.

Stojdl, D. F., Lichty, B. D., tenOever, B. R., Paterson, J. M., Power, A. T., Knowles, S., Marius, R., Reynard, J., Poliquin, L., Atkins, H., Brown, E. G., Durbin, R. K., Durbin, J. E.,

Hiscott, J., and Bell, J. C. (2003). VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* 4, 263-75.

Thorburn, A. (2004). Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal* 16, 139-44.

Thornberry, N. A. and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-6.

Veselska, R., Zitterbart, K., Jelinkova, S., Neradil, J., and Svoboda, A. (2003). Specific cytoskeleton changes during apoptosis accompanying induced differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells. *Oncol Rep* 10, 1049-58.

von Kobbe, C., van Deursen, J. M., Rodrigues, J. P., Sitterlin, D., Bachi, A., Wu, X., Wilm, M., Carmo-Fonseca, M., and Izaurralde, E. (2000). Vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits host cell gene expression by targeting the nucleoporin Nup98. *Mol Cell* 6, 1243-52.

Whelan, S. P. and Wertz, G. W. (1999). Regulation of RNA synthesis by the genomic termini of vesicular stomatitis virus: identification of distinct sequences essential for transcription but not replication. *J Virol* 73, 297-306.

World Health Organization. (2005). Cancer prevention and control. WHO, Geneva.

Wolf, B. B. and Green, D. R. (1999). Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 274, 20049-52.

Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., and Felgner, P. L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247, 1465-8.

Wu, N. and Atai, M. M. (2000). Production of viral vectors for gene therapy applications. *Curr Opin Biotechnol* 11, 205-8.

Wyborski, D. L., Bauer, J. C., and Vaillancourt, P. (2001). Bicistronic expression of ecdysone-inducible receptors in mammalian cells. *Biotechniques* 31, 618-20, 622, 624.

Wyllie, A. H. (1987). Apoptosis: cell death in tissue regulation. *J Pathol* 153, 313-6.

Xiao, Y. Y., Beilstein, M. A., Wang, M. C., Purintrapiban, J., and Forsberg, N. E. (2003). Development of a ponasterone A-inducible gene expression system for application in cultured skeletal muscle cells. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 79-85.

Xu, Z. L., Mizuguchi, H., Mayumi, T., and Hayakawa, T. (2003). Regulated gene expression from adenovirus vectors: a systematic comparison of various inducible systems. *Gene* 309, 145-51.

Yuan, H., Puckett, S., and Lyles, D. S. (2001). Inhibition of host transcription by vesicular stomatitis virus involves a novel mechanism that is independent of phosphorylation of TATA-binding protein (TBP) or association of TBP with TBP-associated factor subunits. *J Virol* 75, 4453-8.

Yuan, J. and Horvitz, H. R. (2004). A first insight into the molecular mechanisms of apoptosis. *Cell* 116, S53-6, 1 p following S59.

Zabala, M., Wang, L., Hernandez-Alcoceba, R., Hillen, W., Qian, C., Prieto, J., and Kramer, M. G. (2004). Optimization of the Tet-on system to regulate interleukin 12 expression in the liver for the treatment of hepatic